UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
Nov 19 '58

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

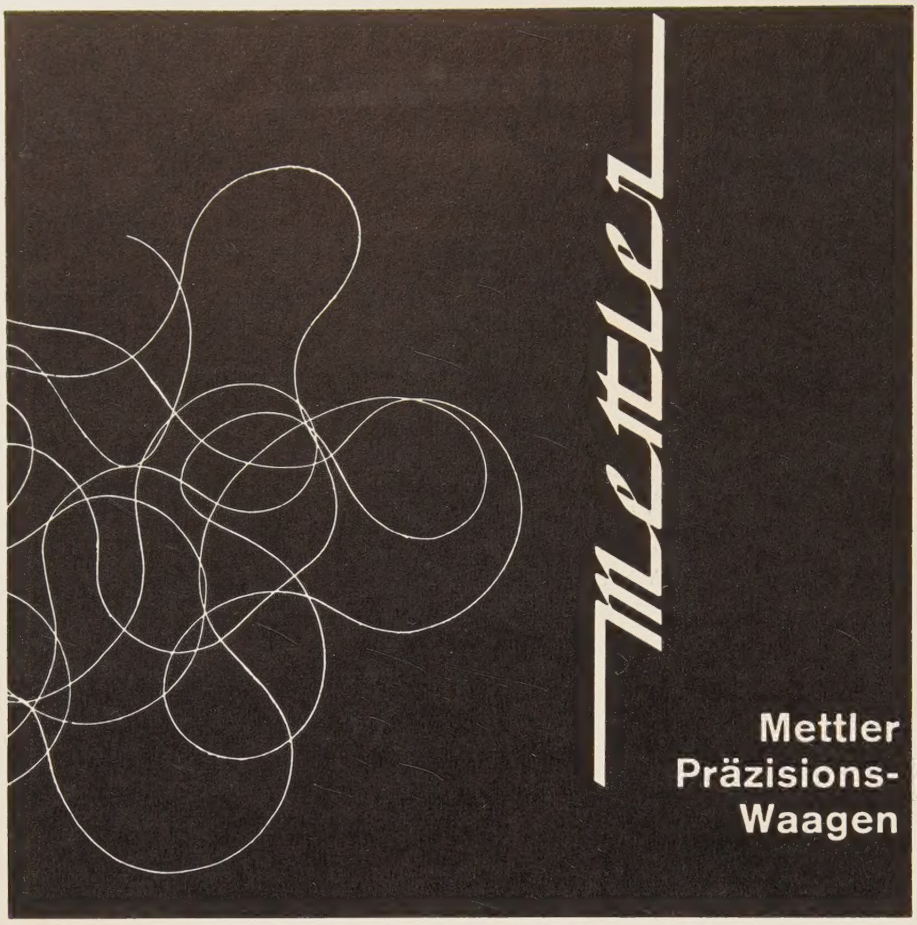
E. F. Jenny, Marjorie C. Caserio und J. D. Roberts: Benzyn-Zwischenprodukte in der nukleophilen aromatischen Substitution 349

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

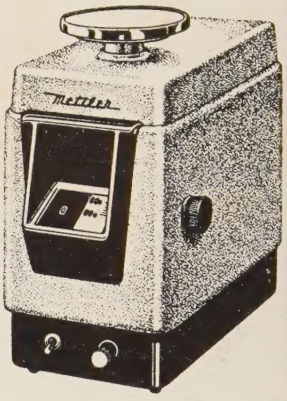
C. E. Inman, E. A. Tyczkowski, R. E. Oesterling, and F. L. Scott: A Novel Fluorination Reaction: The Interaction of Perchloryl Fluoride with Active Methylene Compounds 355
P. G. Waser: Struktur und Wirkung des Muscarins, des Muscarons und ihrer Stereoisomeren 356
S. Sperti e V. Moret: Sul meccanismo della eptoformazione non ossidativa nel muscolo scheletrico 358
V. Moret e M. Lorini: Sulla biochimica della fermentazione citrica da parte dell'*Aspergillus niger* 359
A. Sarachek: The Free Amino Acid Contents and Growth Rates of Polyploid *Saccharomyces* 360
H. Hess und P. Speiser: Verteilungskoeffizient und bakterizide Wirkung von Phenolen und aromatischen Alkoholen 362
A. Temperli and P. W. Wilson: Oxidative Phosphorylation and Nitrogen Fixation by Cell-Free Extracts of the Azotobacter 363
R. Meier, L. Neipp und W. Kunz: Eintritt und Mechanismus phagenhemmender Wirkungen 364
R. Meier und Bertha Schär: Ähnlichkeit und Unterschied Leukozytenemigrationsfördernder Wirkung gram-positiver und gram-negativer Bakterien 366
E. Nakano and A. Monroy: Some Observations on the Metabolism of S^{35}-Methionine During Development of the Sea Urchin Eggs 367
P. S. Chen: Further Studies on Free Amino-Acids and Peptides in Eggs and Embryos of Different Sea-Urchin Species and Hybrids 369
H. Grossfeld: Fat Formation and Glycolysis in Tissue Culture Action of Hydrocortisone 371
B. Kawin: Effects of Cortisone and Ethylenediamine-Tetraacetic Acid on Deposition of Promethium (Pm^{147}) . . 373
J. Kellen and T. Kološ: The Electrophoretic Distribution of Protein-Bound Carbohydrates in Asthma Bronchiale 375
W. Doepfner und A. Cerletti: Über die Entstehung von Serotonin aus 5-Hydroxytryptophan nach UV.-Bestrahlung 376
J. Frei, N. Canal, and E. Gori: Novobiocin as Uncoupling Agent 377
H. Weidmann, M. Taeschler und H. Konzett: Zur Pharmakologie von Psilocybin, einem Wirkstoff aus *Psilocybe mexicana* Heim 378
F. Tischendorf und A. Linnartz-Niklas: Autoradiographische Untersuchungen zur Frage des Eiweißstoffwechsels in den lymphoretikulären Organen 379
G. Thines: Beobachtungen über die Phototaxis und die Thermotaxis des blinden Höhlenfisches *Caecobarbus geertsi* Blgr (Cyprinidae) 381
H. Rauch and W. B. Nutting: Biotin Deficiency in the Hamster 382
E. G. Stenger: Zur Frage der entzündungshemmenden Wirkung des Phenylbutazon bei hypothyreotischen Ratten 383
E. Ackerman, A. Anthony, and F. Oda: Description of a Corona-Type Loudspeaker Used in Bioacoustic Research (Pro Experimentis) 384

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Dida M. Clausen, G. Koller und H. Kuhnen: Unterliegt die Heimkehrgeschwindigkeit der Brieftauben hormonalen Einflüssen? (Studiorum Progressus) 386



E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich



Die modernen
Schnellwaagen
für Industrie
Gewerbe
und Handel

P 1

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIV/4

Maggioni & C., S. p. A., Milano
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel

Ciba AG., Basel
Ganz Optar AG., Zürich
J. R. Geigy AG., Basel

Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstrasse
N. Zivy & Cie. S.A., Basel.

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 44.–; other countries sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1958 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 231810; Telegrammadresse: Edita Basel*

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

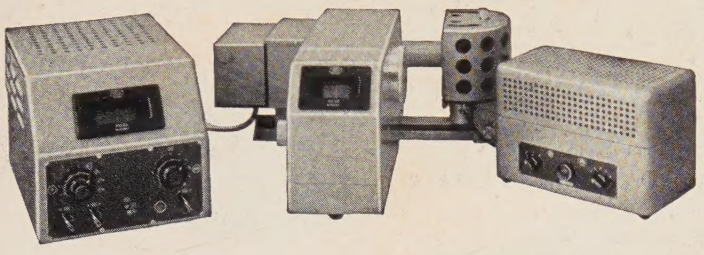
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr).
- **Meßbereich:** 200–2500 mμ.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1P28 und PbS-Photo-Widerstand.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** mit nur 0,2 cm^3 Füllvolumen pro Zentimeter Schichtlänge.
- **Flammen-, Fluoreszenz-, Remissions- und Chromatogrammzusätze.**

Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 50–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG

ZÜRICH

Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 23 97 73

FESTSCHRIFT
JAKOB ACKERET

zum 60. Geburtstag am 17. März 1958

777 Seiten, broschiert Fr. 24.–
Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik (ZAMP)
Vol. IXb, 5/6, 1958

AUTOREN

Ashley, H.
Baxter, D. C.
Berg, B. van den
Bergh, H.
Berndt, S. B.
Betz, A.
Brieden, K.
Broer, L. J. F.
Bruhn, G.
Brunelle, E.
Busemann, A.
Chaix, B.
Darrieus, G.
Driest, E. R. van
Dryden, H. L.
Eckert, E. R. G.
Feindt, E. G.
Flügge-Lotz, I.
Frössel, W.
Gerber, A.
Ginsburg, Th.
Görtler, H.
Grassmann, P.
Greber, I.
Grohne, D.
Gygi, H.
Haack, W.
Haan, R. E. de
Hakkinen, R. J.
Hartnett, J. P.
Heinz, C.
Hutton, St. P.
Jaquet, E.
Jaray, P.
Jarre, G.
Kármán, Th. von
Keller, C.
Kraft, H.
Lukasiewicz, J.
Maeder, P. F.
Manohar, R.
Meyer, L.
Meyer, R. E.
Moser, H. H.
Oswatitsch, K.
Oudart, A.
Pauli, W.
Plaskowski, Z.
Resler jr., E. L.
Rossow, V. J.
Roth-Desmeules, E.
Rott, N.
Roy, M.
Rudinger, G.
Rutishauser, H.
Sänger, E.
Sänger, R.
Sauer, R.
Schardin, H.
Schlichting, H.
Schmidt, E.
Schultz-Grunow, F.
Sears, W. R.
Shapiro, A. H.
Spannhake, W.
Sprenger, H.
Strscheletzky, M.
Stüssi, F.
Tank, F.
Teipel, I.
Theodorides, Ph.
Thommen, H. U.
Traupel, W.
Trilling, L.
Walz, A.
Wattenwyl, R.
Wenk, F.
Weske, J. R.
Winternitz, F. A. L.
Witting, H.
Zand, St. J.
Ziegler, H.
Zierep, J.

Zu beziehen durch die Buchhandlungen
Obtainable from your bookseller

Birkhäuser Verlag · Basel und Stuttgart

MAGGIONI & C. S.p.A.

MILANO (Italy) – Via G. Colombo, 40

Original products from our

Research Laboratories

Coralgil
(4,4′-diethylaminoethoxy-α,β-diethyl-diphenyl ethane)
coronary vasodilator

Elvetil
(triethyl-(β-4-stilbenoxy-ethyl)-ammonium iodide
parasympathotropic ganglioplegic

Fluidemin
(p-bromophenyl-indandione)
synthetic anticoagulant

Idro P_2
(4-methyl-esculetol disulfate)
capillary protecting factor

Liosol
(diphenylyl-ethylacetic acid)
hypocholesterolemic agent

*

1758 1958

Geigy heute

200 Jahre nach seiner Gründung zählt das Geigy-Unternehmen zu den führenden schweizerischen Firmen der Chemie. Als ein auf wissenschaftlicher Grundlage arbeitendes Unternehmen nimmt Geigy an vorderster Stelle teil am grossen Entwicklungsprozess, der dank den modernen Naturwissenschaften unsere Welt von heute prägt.
Von seiner Produktion exportiert das Basler Stammhaus rund neun Zehntel ins Ausland; der Erlös dieser Produkte fliesst zu beträchtlichen Teilen wieder in die schweizerische Wirtschaft zurück. Er verhilft zahlreichen Menschen zum Lebensunterhalt, gibt andern Firmen Arbeit und unterstützt den Staat bei der Durchführung seiner Aufgaben.

Eine 200jährige Geschichte ist für ein wirtschaftliches Unternehmen nicht möglich ohne von Jahr zu Jahr neue Leistungen. Mit dem Mottenschutzmittel Mitin, den DDT-Produkten, den Rheumapräparaten, den Irgalanfarbstoffen, neuen Veredlungsprodukten für die Kunststoff-, Papier- und Seifenindustrie und Mitteln zur Schädlingsbekämpfung hat das Geigy-Unternehmen in den letzten Jahren bewiesen, dass seine Tradition lebendig geblieben ist.
Im Jubiläumsjahr 1958 gilt der Dank der Firma den zahlreichen früheren und heutigen Kunden, Mitarbeitern und Freunden im In- und Ausland. Getragen von ihrer Treue tritt Geigy voll Zuversicht das 3. Jahrhundert an.

J. R. Geigy A.G., Basel
und die Geigy-Gesellschaften der ganzen Welt

EXPERIENTIA

Vol. XIV - Fasc. 10 Pag. 349–388 15. X. 1958

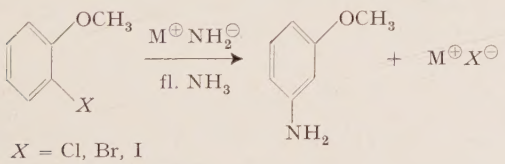
Benzyn-Zwischenprodukte in der nukleophilen aromatischen Substitution

Von Erwin F. Jenny*, Marjorie C. Caserio** und John D. Roberts**

Eine von G. Wittig[1] kürzlich publizierte Zusammenfassung machte den deutschsprechenden Leser in erster Linie mit der Bildungsweise und den synthetischen Anwendungsmöglichkeiten von Benzyn bekannt. Die im englischen Sprachbereich wohl bekannten amerikanischen Arbeiten mehr theoretischen Charakters wurden dabei weniger berücksichtigt. Es ist der Zweck dieses Übersichtsreferates, diese Lücke in der deutschen Literatur auf dem äusserst wichtigen und entwicklungsfähigen Gebiet der Benzyn-Zwischenprodukte auszufüllen.

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass sich nichtaktivierte aromatische Halogenide mit Metallamiden zu Anilinen umsetzen lassen. Nach Bergstrom *et al.*[2] führt dieser Weg in mässiger bis guter Ausbeute zu Anilinderivaten, wenn Natrium- oder Kaliumamid in flüssigem Ammoniak oder Lithiumdiäthylamid in Äther verwendet wird. Dabei treten oft Umlagerungen auf, das heisst die Aminogruppe sitzt nicht immer am Ort des substituierten Halogenatoms. Gilman *et al.*[3] haben als erste diese aussergewöhnlichen Umlagerungen systematisch untersucht. Aus der grossen Zahl ihrer Beispiele seien drei typische Fälle herausgegriffen:

a) *o*-Halogen-anisole liefern unter Aminierungsbedingungen ausschliesslich *m*-substituierte Anisidine[4]. Fluorbenzol und *o*-Fluoranisol reagieren nicht merklich mit Natriumamid in flüssigem Ammoniak.

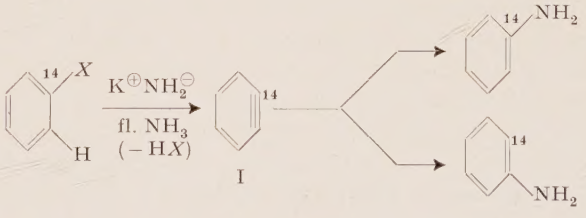


X = Cl, Br, I

b) Die Aminierung *m*-halogenierter Anisole gibt die entsprechenden *m*-Anisidine ohne nachweisbare Mengen eines Umlagerungsproduktes[5].

c) *p*-Bromanisol reagiert leicht mit Lithiumdiäthylamid in Äther. Es entsteht dabei ein Gemisch von *m*- und *p*-N,N-Diäthylanisidin im ungefähren Verhältnis 1:1[6]. Das entsprechende *o*-Anisidin konnte nicht nachgewiesen werden.

Dieses Schema der Aminierungsumlagerungen ist erstaunlich unabhängig von den Einflüssen, die normalerweise die aromatische Substitution beherrschen. Ausser in Spezialfällen spielt auch die Natur des Halogens, Lösungsmittels und Metallamids nur eine untergeordnete Rolle. In keinem der untersuchten Beispiele wurde die eintretende Aminogruppe mehr als ein Kohlenstoffatom von der Stellung des abgehenden Halogens entfernt gefunden, und mindestens ein Wasserstoffatom in *o*-Stellung zum Halogen ist eine notwendige Voraussetzung für die Substitutionsreaktion. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die zu aminierenden Halogenbenzole und deren Reaktionsprodukte unter den angewandten Versuchsbedingungen nicht isomerisiert werden. Die Umlagerung scheint also aufs engste mit dem eigentlichen Vorgang der Aminierung verknüpft zu sein.



Um der aussergewöhnlichen Art dieser Umlagerungsreaktionen gerecht zu werden, ist ein Eliminations-Additions-Mechanismus postuliert worden. Darin nimmt «Benzyn» (I) als Zwischenprodukt eine Schlüsselstellung ein. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden in der 1-Stellung mit ^{14}C markierte Halogenbenzole aminiert und die Verteilung des radioaktiven Kohlen-

* Pharm.-wiss. Abteilung der CIBA A.-G., Basel.

** California Institute of Technology, Pasadena 4, California, U.S.A. Contribution No. 2390.

[1] G. Wittig, Angew. Chem. *69*, 245 (1957).

[2] F. W. Bergstrom, R. E. Wright, C. Chandler und W. A. Gilkey, J. org. Chem. *1*, 170 (1936).

[3] H. Gilman, R. H. Kyle und R. A. Benkeser, J. Amer. chem. Soc. *68*, 143 (1946). – H. Gilman und R. H. Kyle, ibid. *70*, 3945 (1948). – H. Gilman und S. Avakian, ibid. *67*, 349 (1945).

[4] J. D. Roberts, C. W. Vaughan, L. A. Carlsmith und D. A. Semenow, ibid. *78*, 611 (1956). – H. Gilman und S. Avakian, ibid. *67*, 349 (1945).

[5] J. D. Roberts, C. W. Vaughan, L. A. Carlsmith und D. A. Semenow, J. Amer. chem. Soc. *78*, 611 (1956).

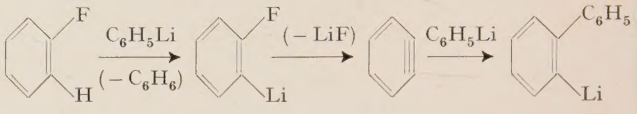
[6] H. Gilman und R. H. Kyle, J. Amer. chem. Soc. *70*, 3945 (1948).

stoffs im Endprodukt bestimmt[7]. Anilin-1-^{14}C und Anilin-2-^{14}C entstanden dabei in ungefähr gleichen Mengen, wie man das von einem Zwischenprodukt mit den Symmetrieeigenschaften von Benzyn erwarten kann.

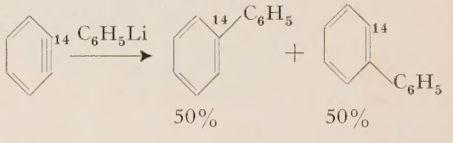
Die Berechtigung der Annahme, dass die Aryne (Sammelbegriff für Benzyn sowie homologe und substituierte Benzyne) eigentliche Zwischenprodukte und nicht bloss Komplexe im Übergangszustand darstellen, wird kräftig gestützt durch den Befund, dass verschiedene Verbindungen, die gegenüber Halogenbenzolen inert sind, diese Zwischenprodukte abfangen können. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Triphenylmethylkalium mit Brom- oder Chlorbenzol in flüssigem Ammoniak nicht reagiert. Wird hingegen Kaliumamid zugefügt, so entsteht Tetraphenylmethan in 40-prozentiger Ausbeute[8]. Diese Resultate können vernünftig erklärt werden, wenn man annimmt, dass das Kaliumamid das Halogenbenzol in Benzyn überführt und dieses in einer nachfolgenden Reaktion mit Triphenylmethylkalium und Ammoniak Tetraphenylmethan liefert. Neuere Studien[9] haben jedoch gezeigt, dass weder das Mass der Nukleophilie (wie man es gegenüber Alkylhalogeniden findet) noch die Basenstärke eines gegebenen Agens dessen Reaktivität gegenüber Benzyn zu bestimmen scheinen. Die bis jetzt zusammengetragenen Befunde über die Fähigkeit der verschiedenen Nukleophile, Benzyn in Konkurrenzreaktionen abzufangen, deuten darauf hin, dass dieses Zwischenprodukt wahrscheinlich höchst instabil ist. In diesem Zusammenhange sei erwähnt, dass das Thiophenolation das Zwischenprodukt Benzyn in flüssigem Ammoniak in Gegenwart von Kaliumamid bemerkenswert leicht abfängt. Ausbeuten bis zu 60% an Thiophenyl-substituierten Produkten werden dabei erhalten.

Bei einer Anzahl verwandter Reaktionen kommen ähnliche Umlagerungen vor, die ebenfalls auf einen Benzyn-artigen Mechanismus schliessen lassen. So reagieren *p*-Chlor-, *p*-Brom- und *p*-Iodtoluol mit Kaliumanilid in siedendem Anilin und liefern jeweils 53% *p*- und 47% *m*-Tolyl-phenylamin[10]. Die Tatsache, dass alle drei *p*-Halogentoluole zur gleichen Produktezusammensetzung führen, spricht für die Substitution über ein Aryn-Zwischenprodukt. Weitere Beispiele sind die Hydrolyse von Arylhalogeniden in flüssiger Phase bei hoher Temperatur[11] und die Kuppelungsreaktion von Phenyllithium mit Arylhalogeniden[12].

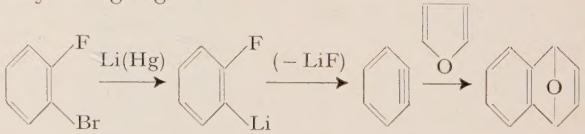
WITTIG *et al.*[13] haben als erste die Kuppelungsreaktion zwischen Fluorbenzol und Phenyllithium zu *o*-Lithium-diphenyl untersucht. Sie schlugen das intermediäre Auftreten eines Zwitterions der Formel C_6H_4[14] als Reaktionsmechanismus vor. Das Reaktionsgeschehen findet allerdings in dem Benzyn-Zwischenprodukt eine viel ungezwungenere Erklärung:



Die Entstehung eines symmetrischen Zwischenproduktes C_6H_4 im Verlaufe dieser Phenylierungsreaktion wurde wie bei der Aminierung der Halogenbenzole mit Hilfe einer Isotopenmethode geprüft: Fluorbenzol wurde in der 1-Stellung mit ^{14}C markiert und mit Phenyllithium umgesetzt. Die gefundene Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffs stimmt voll und ganz mit dem vorgeschlagenen Benzyn-Mechanismus überein:

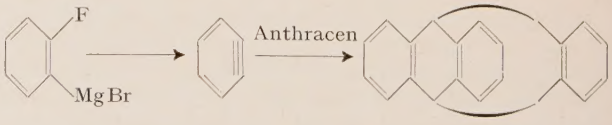


WITTIG und POHMER[15] konnten die Bildung von Benzyn auf elegante Art demonstrieren. Es gelang ihnen, das in der Reaktion von *o*-Fluorbrombenzol mit Lithiumamalgam in Furan intermediär gebildete Benzyn als 1,4-Dihydronaphthalin-1,4-endoxyd (II) abzufangen. Die Reaktion kann als eine Art Diels-Alder-Addition von Furan an die «Dreifach»-Bindung von Benzyn ausgelegt werden:



II

Eine ähnliche Reaktion zwischen *o*-Fluorphenyl-Magnesiumbromid und Anthracen gab eine 28-prozentige Ausbeute an Triptycen[16].



Triptycen

[7] J. D. ROBERTS, H. E. SIMMONS, JR., L. A. CARLSMITH und C.W. VAUGHAN, ibid. *75*, 3290 (1953); J. D. ROBERTS, D. A. SEMENOW, H. E. SIMMONS, JR. und L. A. CARLSMITH, ibid. *78*, 601 (1956).

[8] F. W. BERGSTROM, R. E. WRIGHT, C. CHANDLER und W. A. GILKEY, J. org. Chem. *1*, 170 (1936). – R. E. WRIGHT und F. W. BERGSTROM, ibid. *1*, 179 (1936). – R. A. SEIBERT und F. W. BERGSTROM, ibid. *10*, 544 (1945). – F. W. BERGSTROM und R. AGOSTINHO, J. Amer. chem. Soc. *67*, 2152 (1945). – P. H. DIRSTINE und F. W. BERGSTROM, J. org. Chem. *11*, 55 (1946).

[9] F. SCARDIGLIA und J. D. ROBERTS, Tetrahedron (im Druck).

[10] F. SCARDIGLIA und J. D. ROBERTS, J. org. Chem. *23*, 629 (1958).

[11] J. D. ROBERTS, A. T. BOTTINI und D. A. SEMENOW, Science *122*, 881 (1955). – A. T. BOTTINI und J. D. ROBERTS, J. Amer. chem. Soc. *79*, 1458 (1957). – A. LÜTTRINGHAUS und D. AMBROS, Ber. dtsch. chem. Ges. *89*, 463 (1956).

[12] G. WITTIG, G. PIEPER und G. FUHRMANN, ibid. *73*, 1193 (1940); G. WITTIG, Naturwiss. *30*, 700 (1942); Angew. Chem. *69*, 245 (1957). – E. F. JENNY und J. D. ROBERTS, Helv. chim. Acta *38*, 1248 (1955).

[13] G. WITTIG, G. PIEPER und G. FUHRMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. *73*, 1193 (1940).

[14] G. WITTIG, Naturwiss. *30*, 700 (1942).

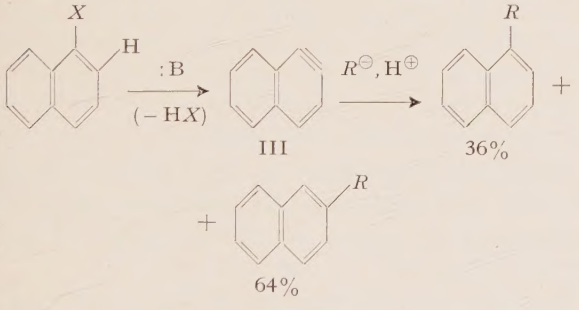
[15] G. WITTIG und L. POHMER, Angew. Chem. *67*, 348 (1955), Ber. dtsch. chem. Ges. *89*, 334 (1956). – Vgl. auch H. GILMAN und R. D. GORSICH, J. Amer. chem. Soc. *79*, 2625 (1957).

[16] G. WITTIG und R. LUDWIG, Angew. Chem. *68*, 40 (1956).

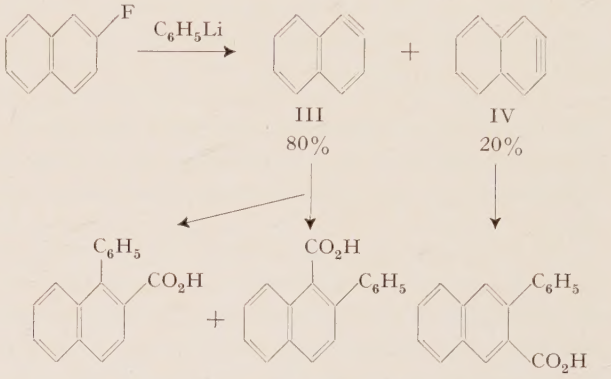
Tabelle
Produkteverteilung in gewissen nukleophilen Substitutionen an α-Halogennaphthalinen

Halogen	Reaktion	Literatur	Produkte	% α-	% β-
Cl, Br, I	$NaNH_2$-Piperidin	18	N-Naphthylpiperidin . . .	32	68
F	C_6H_5Li–CO_2	17	Phenyl-naphthoesäure . .	37	63
Cl, Br, I	Lithiumpiperidid in Äther	19	N-Naphthylpiperidin . . .	33	67
F	*n*-Butyllithium–CO_2 . . .	17	*n*-Butylnaphthoesäure . .	33	67
F	*t*-Butyllithium–CO_2 . . .	17	*t*-Butylnaphthoesäure . .	34	66
Cl	Lithiumdiäthylamid . . .	17	N-Naphthyldiäthylamin . .	38	62
Cl	Lithiumdiisobutylamid . .	17	N-Naphthyldiisobutylamin	36	64
Cl	C_6H_5Li-Piperidin-H_2O . .	17	Phenylnaphthalin	35	65

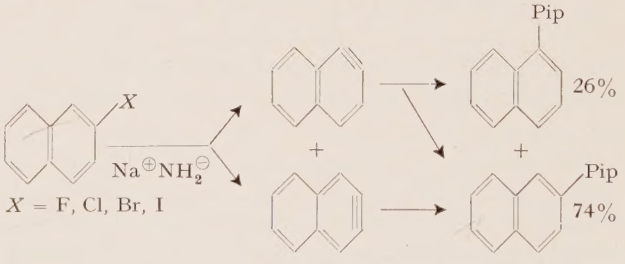
Eine Reihe interessanter Umlagerungen wurde bei der Einwirkung verschiedener Basen auf α- und β-Halogennaphthaline beobachtet. Die Arbeiten von HUISGEN *et al.*[17] sowie BUNNETT und BROTHERTON[18] haben gezeigt, dass in vielen Fällen aus den α-Halogennaphthalinen α- und β-substituierte Naphthaline entstehen, und zwar in einem Verhältnis, das unabhängig ist von der Art des basischen Reagens: weder dessen Grösse noch Basenstärke scheint sich auf die Produktezusammensetzung auszuwirken. Die Zahl der Beispiele ist zu gross, als dass diese einzeln aufgeführt werden könnten. Die wichtigsten Daten sind jedoch in der Tabelle zusammengefasst. Die auf den ersten Blick nur schwer verständlichen Resultate können leicht auf einen Nenner gebracht werden, wenn man für alle diese Reaktionen ein gemeinsames Zwischenprodukt annimmt: 1-Naphthalyn (III):



Die Reaktionen von α-Chlor-, Brom- und Iodnaphthalin mit Lithiumpiperidid in Äther scheinen ausschliesslich über 1-Naphthalyn zu verlaufen, da sowohl α- als auch β-Halogenverbindungen zur gleichen Zusammensetzung an Produkten führt[19]. Es existieren jedoch Daten, welche andeuten, dass auch 2-Naphthalyn (IV) gebildet werden kann. So wurde zum Beispiel aus der Reaktion von Phenyllithium mit β-Fluornaphthalin und anschliessender Carbonierung 2-Phenyl-3-naphthoesäure in 20-prozentiger Ausbeute isoliert[17]:



Ebenso führen α- und β-Halogennaphthaline bei der Reaktion mit Piperidin in Gegenwart von Natriumamid nicht zur gleichen Verteilung an α- und β-Naphthylpiperidin, was darauf hinweist, dass aus dem 2-Isomeren wahrscheinlich kleine Mengen 2-Naphthalyn entstehen[18]:



Das bis jetzt gelieferte Beweismaterial stützt in recht überzeugender Weise die Hypothese der Aryn-Zwischenprodukte in nukleophilen Substitutionen nichtaktivierter Arylhalogenide. Dies will allerdings nicht besagen, dass der Aryn-Mechanismus notgedrungen der alleinige Reaktionsmodus wäre. Die vielen Daten, die sich in den letzten Jahren angesammelt haben, beweisen nämlich, dass direkte und Aryn-artige Substitution nebeneinander verlaufen können. Die Faktoren, die dabei die relativen Anteile der beiden Mechanismen bestimmen, sind äusserst empfindlich gegenüber geringfügigen Änderungen. In der Naphthalinreihe zeigt α-Fluornaphthalin die grösste Empfindlichkeit gegenüber der direkten Substitution. Dies ist gut vereinbar mit der Stellung der Fluoride in der Reaktivitätsfolge F ≫ Cl, Br, I, die man bei der direk-

[17] R. HUISGEN und H. RIST, Naturwiss. *41*, 358 (1954). – R. HUISGEN und J. SAUER, Angew. Chem. *69*, 390 (1957). – R. HUISGEN und L. ZIRNGIBL, ibid. *69*, 389 (1957). – R. HUISGEN, J. SAUER und A. HAUSER, ibid. *69*, 267 (1957).

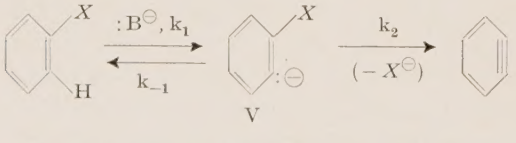
[18] J. F. BUNNETT und T. K. BROTHERTON, J. Amer. chem. Soc. *78*, 155, 6265 (1956).

[19] R. HUISGEN und J. SAUER, Angew. Chem. *69*, 390 (1957).

ten nukleophilen Substitution an aktivierten Arylhalogeniden beobachtet[20]. GILMAN[21] hat zum Beispiel gefunden, dass sich aus α-Fluornaphthalin und Kaliumamid in flüssigem Ammoniak ausschliesslich α-Naphthylamin bildet. Auch mit Piperidin in Gegenwart von Natriumamid[18] und mit Lithiumpiperidid in Piperidin[13] entstehen aus α-Fluornaphthalin beachtliche Mengen α-Naphthylpiperidin durch direkte Substitution. Im letzteren Fall hängt das Ausmass der direkten Substitution entscheidend vom Molverhältnis Lithiumpiperidid-Piperidin ab. HUISGEN und Mitarbeiter[19] haben diese Tatsachen auf eine sehr plausible Weise zu erklären vermocht: eine hohe Konzentration an Piperidin wird der Entstehung des 2-(α-Fluor)-naphthylanions (vgl. die folgende Diskussion über die Mechanismen der Aryn-Bildung) nach dem Massenwirkungsgesetz entgegenwirken und daher die Substitution mit direktem Halogenaustausch begünstigen. Ähnliche Argumente lassen sich für die Aminierung von α-Fluornaphthalin bei grossem Ammoniaküberschuss anführen.

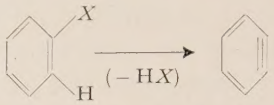
Ein weiteres eindrückliches Beispiel dieses Doppelmechanismus ist die Hydrolyse von Chlorbenzol und Halogentoluolen bei erhöhter Temperatur[11]. Es wurde gefunden, dass Chlorbenzol-1-^{14}C mit 4-*m*. Natriumhydroxyd bei 340° hydrolysiert und dabei 58% Phenol-1-^{14}C und 42% Phenol-2-^{14}C liefert. Dies bedeutet, dass unter diesen Bedingungen der Benzyn-Mechanismus vorherrscht, dass aber ein bedeutender Teil des Halogens direkt substituiert wird. Der die direkte Substitution konkurrenzierende Benzyn-Mechanismus wurde auch zur Erklärung der Umlagerungen, die bei der Hydrolyse der Halogentoluole auftreten, herangezogen. Tiefere Temperaturen, schwächere Basen und leichter ionisierbare Halogene begünstigen die direkte Substitution, wie man das von einem S_N2-artigen Mechanismus erwartet.

Das Auftreten von Benzyn in gewissen nukleophilen Substitutionen scheint nach den bis jetzt angeführten Tatsachen recht plausibel. Die Art und Weise, wie dieses Zwischenprodukt aus Arylhalogeniden gebildet wird, soll nun ausführlich diskutiert werden. Die Elimination von Halogenwasserstoff zu Benzyn kann über zwei verschiedene Wege verlaufen: eine Base $:B^{\ominus}$ kann in einer Gleichgewichtsreaktion ein Proton aus dem Arylhalogenid entfernen und das Carbanion (V) erzeugen. Dieses kann ein Halogenidion in einem folgenden, irreversiblen Schritt verlieren und in das neutrale, symmetrische Benzyn übergehen [Gleichung (1)]:



V (1)

Die zweite Variante besteht in einer synchronen Elimination von H*X* mit Hilfe der Base $:B^{\ominus}$ [Gleichung (2)]:



(2)

$k_H/k_D \sim 6$–7

In einer Untersuchung der Kinetik der Aminierung von *o*-deuterierten Halogenbenzolen[22] konnte zwischen diesen beiden Mechanismen leicht unterschieden werden. Wenn nämlich das Ablösen eines Protons in einer synchronen Elimination von H*X* der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aminierungsreaktion ist, so sollte ein *o*-deuteriertes Halogenid 6–7mal langsamer reagieren als sein Wasserstoffanaloges. Für die Aminierung von Brombenzol-2-^{2}H (*o*-Deuterobrombenzol) wurde ein Isotopieeffekt von 5,5 gefunden. Dieser Wert stimmt in erster Annäherung gut mit dem für eine synchrone Elimination vorausgesagten Effekt überein [Gleichung (2)]. Chlorbenzol-2-^{2}H reagiert jedoch unter den gleichen Bedingungen 2,7mal langsamer als Chlorbenzol. Dieser wesentlich kleinere Isotopieeffekt lässt vermuten, dass Chlorwasserstoff in einem stufenweisen Prozess verloren geht [Gleichung (1)]. Das zuerst gebildete Carbanion (V, $X = Cl$) kann durch Verlust eines Chloridions in Benzyn übergehen oder durch Entreissen eines Protons vom Lösungsmittel zu Chlorbenzol zurückkehren. Die Grösse des Isotopieeffektes hängt demnach vom Verhältnis der Geschwindigkeiten dieser beiden Reaktionen ab (k_2/k_{-1}). In den Extremfällen, wo $k_{-1} \gg k_2$, verschwindet der Isotopieeffekt, und wo $k_2 \gg k_{-1}$, erreicht er ein Maximum, das heisst die Elimination verläuft praktisch nach einem synchronen Mechanismus.

Mit Lithiumdiäthylamid in Äther verläuft die Elimination an Chlorbenzol-2-^{2}H und Brombenzol-2-^{2}H anscheinend synchron; die beobachteten Isotopieeffekte sind nämlich 5,7 bzw. 5,6.

Im Falle von Fluorbenzol-2-^{2}H findet ein rascher Austausch von Deuterium gegen Wasserstoff statt, aber Anilin wird nicht gebildet[23]. Das Carbanion (V, $X = F$) eliminiert unter diesen Bedingungen eben kein Fluoridion. Die Natur des abgehenden Halogens ist eindeutig einer der bestimmenden Faktoren bei der Bildung von Benzyn. Die Reaktivitätsreihe der Halogenbenzole in der Aminierungsreaktion ($Br > I > Cl \gg F$)[2] ist in Wirklichkeit zusammengesetzt aus Reihen zunehmender Azidität der *o*-Wasserstoffe ($F > Cl > Br > I$) und abnehmender Leichtigkeit des Abgangs der Halogenidionen ($I > Br > Cl > F$). Dort, wo dieser Abgang leichter wird als das Entfernen des *o*-Wasserstoffs,

[20] J. F. BUNNETT und R. E. ZAHLER, Chem. Rev. *49*, 273 (1951). – J. F. BUNNETT, Quart. Rev. *12*, 1 (1958).

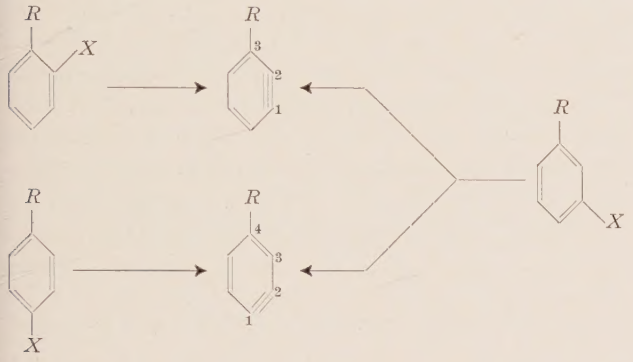
[21] H. GILMAN, N. N. CROUNSE, S. P. MASSIE, JR., R. A. BENKESER und S. H. SPATZ, J. Amer. chem. Soc. *67*, 2108 (1945).

[22] J. D. ROBERTS, D. A. SEMENOW, H. E. SIMMONS, JR. und L.A. CARLSMITH, J. Amer. chem. Soc. *78*, 601 (1956).

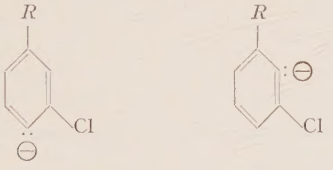
[23] G. E. HALL, R. PICCOLINI und J. D. ROBERTS, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4540 (1955).

erfolgt der Übergang von der stufenweisen zur synchronen Elimination.

Die abnorm anmutenden Orientierungseffekte in Aminierungs- und verwandten Reaktionen an substituierten Halogenbenzolen passen nicht in das gewohnte Schema der direkten nukleophilen Substitution. Sie erscheinen aber durchaus vernünftig, wenn als Grundlage zu ihrer Erklärung der vorgeschlagene Eliminations-Additions-Mechanismus[4] angenommen wird. *o*- und *p*-substituierte Halogenbenzole können Halogenwasserstoff nur so eliminieren, dass dabei 3- *bzw.* 4-Benzyne entstehen. Die Elimination an den entsprechenden *m*-Isomeren kann jedoch 3- *und* 4-Benzyn liefern:



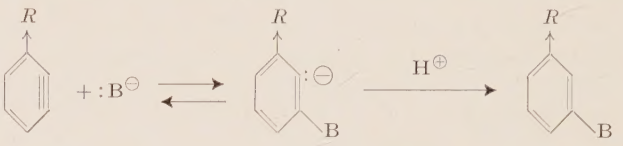
Es ist zu erwarten, dass die relativen Aziditäten der beiden Wasserstoffe in *o*-Stellung zum Halogen und in geringerem Masse die relativen Geschwindigkeiten der Ausstossung des Halogenidions aus den beiden isomeren Anionen VI und VII die Richtung der Elimination in *m*-substituierten Halogenbenzolen bedingen.



VI VII

Die Azidität der Wasserstoffe im Benzol scheint in erster Linie vom induktiven Effekt eines vorhandenen Substituenten abzuhängen[23]. So entsteht zum Beispiel vorzugsweise 3-substituiertes Benzyn, wenn der Substituent elektronenanziehend, hingegen 4-substituiertes Benzyn, wenn er elektronenabstossend ist. Die Resultate der Aminierungen von Halogenbenzolen mit Substituenten des induktiv elektronenanziehenden Typs (R=OCH_3, CF_3) stimmen mit diesen Voraussagen gut überein: es entstehen dabei ausschliesslich 3-substituierte Benzyne. Für die schwach elektronenabstossende Methylgruppe ist das am *m*-Bromtoluol bestimmte Verhältnis von 4- zu 3-Methylbenzyn 3:2. Etwas mehr 3-Methylbenzyn entsteht aus *m*-Chlortoluol, was darauf zurückzuführen ist, dass das 2-Anion (VII, R=CH_3) sein Chloridion schneller ausstösst als das 4-Anion (VI, R=CH_3).

Die Richtung der Addition des Nukleophils $:B^{\ominus}$ an die «Dreifach»-Bindung wird ebenfalls durch den induktiven Effekt der Gruppe R bestimmt. Diese wird den Eintritt des Anions so dirigieren, dass die negative Ladung im Addukt am besten stabilisiert werden kann. Nach diesen Überlegungen sollten 3-substituierte Benzyne *m*-substituierte Produkte liefern, wenn R induktiv elektronenanziehend ist. In der Tat geben *o*- und *m*-substituierte Halogenbenzole mit R=OCH_3, CF_3 usw. bei der Aminierung nur *m*-substituierte Aniline.

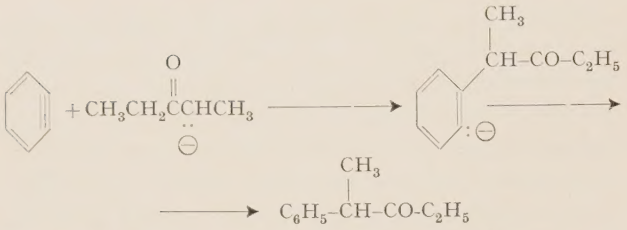


Benzyne mit schwach elektronenabstossendem Substituenten (R=CH_3) sollten nach den gleichen Überlegungen zu Gemischen führen, die sich im Falle von 3-Methylbenzyn aus *o*- und *m*-Produkt (mit etwas mehr vom ersteren), im Falle von 4-Methylbenzyn aus *m*- und *p*-Produkt (wiederum mit etwas mehr vom ersteren) zusammensetzen. Die Addition der Elemente von Ammoniak oder Phenylacetylen an aus *p*-Halogentoluol erhaltenes 4-Methylbenzyn gibt denn auch Gemische von *m*- und *p*-Toluidin[4] bzw. *m*-Tolyl- und *p*-Tolyl-phenylacetylen[9], wobei in beiden Fällen das *m*-Isomere das *p*-Isomere um den gleichen Betrag überwiegt. Diese Resultate decken sich mit den wohlbekannten elektrischen Effekten der Methylgruppe. Aus *o*-Bromtoluol erhaltenes 3-Methylbenzyn addiert die Elemente von Ammoniak oder Phenylacetylen und liefert dabei *o*- und *m*-Produkte im ungefähren Verhältnis 1:1. Es scheint, dass die *o*-Substitution in diesen Fällen sterisch etwas gehindert ist. Wenn nämlich nur elektrische Effekte wirksam wären, so sollten die *o*-Produkte überwiegen. Die in der alkalischen Hydrolyse von Halogentoluolen[24] entstehenden 3- und 4-Methylbenzyne führen nach der Addition der Elemente des Wassers zu Kresolgemischen, deren Zusammensetzung praktisch gleich ist wie diejenige der aus der Aminierung von Halogentoluolen gewonnenen Toluidine.

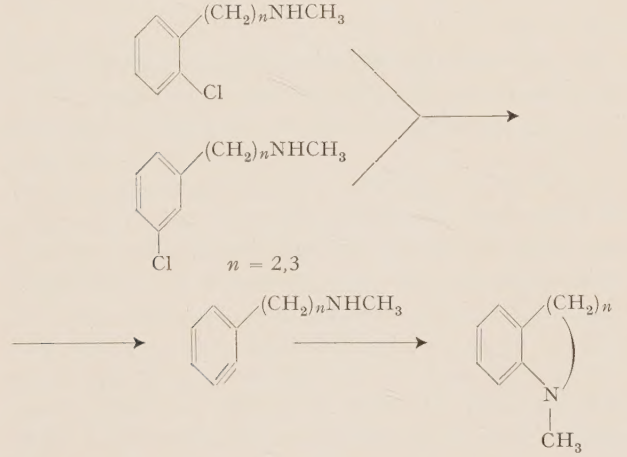
Die Nützlichkeit der Aryne hat sich in einer Anzahl einzigartiger Synthesen erwiesen. Die Bildung von Benzoderivaten aus der Addition von Furan und Anthracen an Benzyn wurde bereits erwähnt[15, 16]. Ketone können als Natriumsalze mit Brombenzol und Natriumamid in flüssigem Ammoniak phenyliert werden[25]. Dieses Verfahren setzt die intermediäre Entstehung von Benzyn aus Brombenzol und Natriumamid voraus:

[24] A. T. Bottini und J. D. Roberts, J. Amer. chem. Soc. *79*, 1458 (1957).

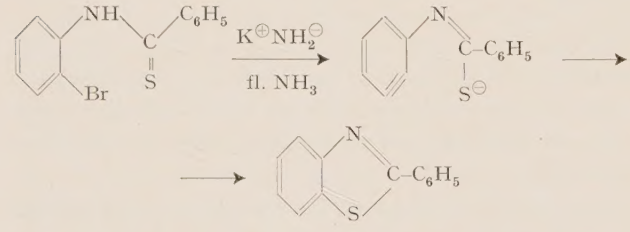
[25] W. W. Leake und R. Levine, Chem. & Ind. *37*, 1160 (1955).



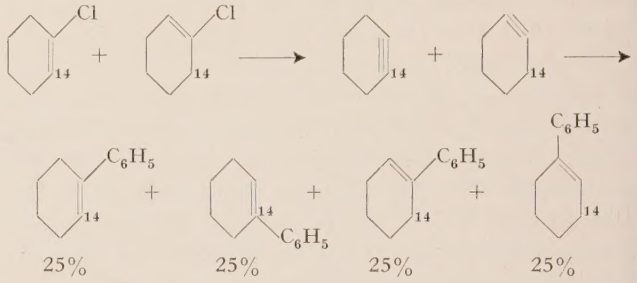
In der Literatur sind auch verschiedene elegante Ringschlüsse beschrieben. Sie bestehen darin, dass die intramolekulare Addition eines nukleophilen Zentrums an die «Dreifach»-Bindung des Aryn-Zwischenproduktes zu ringgeschlossenem Produkt führt. HUISGEN und KÖNIG[26] haben die Synthese von N-Methyl-2,3-dihydroindol und N-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin veröffentlicht:



Die Allgemeingültigkeit dieser Art Ringschluss ist von HRUTFORD und BUNNETT[27] aufgezeigt worden. Aus geeignet substituierten Benzolen synthetisierten diese Autoren fünf- und sechsgliedrige hetero- und isozyklische Verbindungen. Die Herstellung von 2-Phenylbenzothiazol gelang zum Beispiel in 90-prozentiger Ausbeute:



Das bis dahin untersuchte Beweismaterial für den Eliminations-Additions-Mechanismus in nukleophilen Substitutionen betrifft nur die Reaktionen von nichtaktivierten Arylhalogeniden. Höchst wahrscheinlich reagieren jedoch auch Vinylhalogenide nach einem ähnlichen Mechanismus in analogen Substitutionen. Es ist bekannt, dass Vinylchlorid mit Natriummethylat Vinylmethyläther liefert; Acetylen ist dabei das Zwischenprodukt[28]. TRUCE und Mitarbeiter[29] haben gezeigt, dass nukleophile Substitutionen an Dihalogenäthylenen über Chloracetylen verlaufen, während die Reaktion zwischen Phenyllithium und Vinylhalogeniden direkt zu Acetylenen führt[30]. Von beträchtlichem Interesse ist die Frage, ob Acetylene auch als Zwischenprodukte in ähnlichen Substitutionen an alizyklischen Systemen auftreten. Die Beobachtung, dass 1-Chlorcyclohexen mit Phenyllithium kuppelt und kleine Mengen 1-Phenylcyclohexen gibt[31], sowie die Bildung von Dodecahydrotriphenylen (Cyclohexyn-Trimeres) aus 1,2-Dibromcyclohexen mit Natrium[32] lassen Cyclohexyn als wahrscheinliches Zwischenprodukt dieser beiden Reaktionen erscheinen. Eine neulich durchgeführte Studie der Kuppelungsreaktion zwischen Phenyllithium und einem 1:1-Gemisch von 1-Chlorcyclohexen-2-^{14}C und 1-Chlorcyclohexen-6-^{14}C gab 1-Phenylcyclohexen mit 23% der ursprünglichen Radioaktivität in der 1-Stellung[33]. Dieser Wert spricht sehr zugunsten eines via Cyclohexyn verlaufenden Eliminations-Additions-Mechanismus, von dem man eine 25-prozentige Ausbeute an 1-Phenyl-cyclohexen-1-^{14}C erwarten würde:



Abschliessend sei bemerkt, dass Aryne und Cycloacetylene bis heute noch nie gefasst werden konnten, ihre Existenz aber dennoch mit viel solidem Beweismaterial untermauert ist, und dass Nützlichkeit und Abwandlungsfähigkeit der Reaktionen mit derartigen Zwischenprodukten rasch zunimmt[34].

Summary

Many substitution reactions of aromatic halides, such as amination with metallic amides in ammonia or amine solutions, high-temperature alkaline hydrolyses and arylation with phenyllithium, lead to the formation of rearrangement products as the result of a common reaction path involving unstable 'benzyne' intermediates. The chemical evidence in favor of this reaction mechanism is discussed as are correlations of observed product compositions and applications to practical synthetic procedures.

[26] R. HUISGEN und H. KÖNIG, Angew. Chem. *69*, 268 (1957).

[27] B. F. HRUTFORD und J. F. BUNNETT, J. Amer. chem. Soc. *80*, 2021 (1958).

[28] W. REPPE, Deutsche Patente 550403 und 584840.

[29] W. E. TRUCE *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *78*, 695, 2743, 2748, 2752 (1956); *79*, 1770 (1957).

[30] G. WITTIG und H. WITT, Ber. dtsch. chem. Ges. *74*, 1474 (1941).

[31] G. WITTIG und G. HARBOTH, Ber. dtsch. chem. Ges. *77*, 306 (1944).

[32] A. E. FAVORSKY und W. BOSHOWSKY, Liebigs Ann. Chem. *390*, 122 (1912).

[33] F. SCARDIGLIA und J. D. ROBERTS, Tetrahedron *1*, 343 (1957).

[34] J. F. BUNNETT und T. K. BROTHERTON, J. org. Chem. *23*, 904 (1958).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

A Novel Fluorination Reaction: The Interaction of Perchloryl Fluoride with Active Methylene Compounds

When perchloryl fluoride (PF) gas is bubbled through a solution of an active methylene compound in the presence of a base, fluorination occurs. The overall reaction may be represented as follows:

The solvents employed have been either ethanol or ether, and the usual bases used were either sodium ethoxide or sodium metal. In the presence of sufficient base all the available active hydrogens are replaced. For example, reaction of PF with diethyl malonate in the presence of 1 mole of sodium ethoxide in ethanol affords 50% unreacted malonate and 50% diethyldifluoromalonate.

Three types of anions have been employed in this nucleophilic displacement on halogen:

(1) $\rangle C^{\ominus}$: With carbanions reaction is as described above, when A and B are *both* of the type $C{=}X$ or $-C{\equiv}X$. When only one such group is present other reactions, e. g. oxidation or coupling, supercede fluorination.

(2) $-S^{\ominus}$: (or $>S$): With either thiophenoxide ion, or thiophenol itself, in either ethereal or ethanol solution, PF affords diphenyl disulfide.

(3) $-O^{\ominus}$: With sodium ethoxide in ethanol, PF affords diethyl ether and sodium perchlorate. With sodium trifluorethoxide in trifluorethanol, PF yields sodium fluoride and trifluorethyl perchlorate (*I*). When (*I*) is treated with base, sodium *chlorate* is formed and the

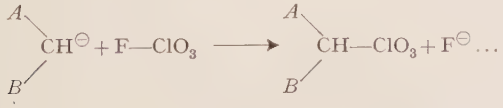
$$CF_3CH_2OClO_3$$
(I)

organic residue is oxidized. The oxidation product has not yet been identified.

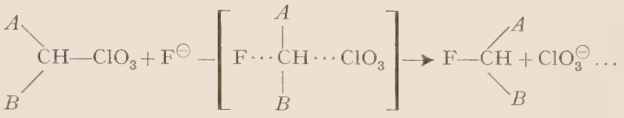
It seems possible that as the anionic functional atom is varied its nucleophilicity towards halogen would change and hence several mechanisms may be operative within the above gamut of reactions. One such mechanism appears to be the direct heterolysis of PF for (example with oxyanion bases).

$$CF_3CH_2O^{\ominus} + FClO_3 \longrightarrow CF_3CH_2OClO_3 + F^{-}\ldots \quad \text{Mode } A$$

With carbanions a similar sequence is possible, for example:

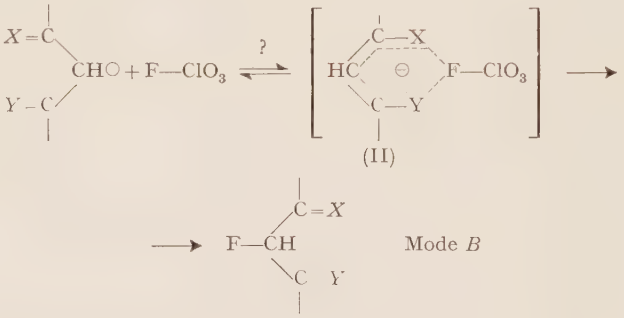


Step I



Step II

This appears unlikely however, as in the presence of bases more nucleophilic towards carbon[1] than fluoride, for example ethoxide, or chloride, ions, none of the anticipated competition with *Step II* is realized. The heterolysis of PF may then take place in a different manner, for instance:



(II)

Mode *B*

The essential postulate in Mode *B* is a one-step fluorination process. The possibility exists, based on the type of compounds, which PF fluorinates, that reaction may proceed through some form of complex such as *II*. Decision between Mode *A* and Mode *B* from the physical structure of PF is not possible, *a priori*, as dipole moment and other physical studies[2], shows PF is neither *III* nor *IV* but is essentially electrostatically balanced.

$$\underset{\text{(III)}}{\overset{\partial-\;\partial+}{F-ClO_3}} \qquad \underset{\text{(IV)}}{\overset{\partial+\;\partial-}{F-ClO_3}}$$

This work will be published in fuller detail elsewhere.

C. E. Inman, E. A. Tyczkowski,
R. E. Oesterling, and F. L. Scott

Research and Development Department, Pennsalt Chemicals Corporation Wyndmoor, Pennsylvania U.S.A., July 11, 1958.

Zusammenfassung

Die Reaktion von Perchloryl Fluorid (PF) mit Anionen wurde untersucht. Eine leichte Difluorierung fand statt mit Carbanionen vom Typus $^{\ominus}CH\,(C{=}X)_2$. Mechanismen für die verschiedenen Heterolysen von PF werden vorgeschlagen.

[1] A. Streitwieser, Chem. Review *56*, 602 (1956).

[2] A. A. Maryott and S. J. Dryder, J. chem. Physics *27*, 1221 (1957) and further references therein.

Struktur und Wirkung des Muscarins, des Muscarons und ihrer Stereoisomeren

Die Konstitution und Konfiguration des Muscarins wurden erst kürzlich endgültig abgeklärt[1] und durch eine stereospezifische Synthese bewiesen[2]. Gleichzeitig gelang es, auf einem andern Weg neben dem natürlichen Muscarin sämtliche Stereoisomerenpaare des Muscarins darzustellen[3]. Wir stellten für reines L-(+)-Muscarinchlorid eine etwas stärkere, im übrigen aber eine dem Acetylcholin sehr ähnliche Wirkung für die gleichen peripheren cholinergischen Rezeptoren fest[4]. An den ganglionären Synapsen ist die Wirkung des Muscarins viel schwächer und fehlt beinahe vollständig für die Endplatte[5]. Die Atomkette des Acetylcholins im Muscarinmolekül erklärt die ähnliche Wirksamkeit, und man kann die Besonderheiten der Muscarinwirkung zum Teil auf den voluminösen Tetrahydrofuranring beziehen[6]. Am starren Ringgerüst sind verschiedene Stellungen der Substituenten möglich, bei denen die Gruppen (Hydroxyl, Methyl, Methyltrimethylammonium), die wir für die pharmakologische Wirkung, das heisst die Bindung mit den Pharmorezeptoren[7] der Zelle verantwortlich machen, in eine fest definierte Lage zueinander kommen. Es ist daher von besonderem Interesse, die Wirksamkeit der Stereoisomeren mit dem natürlich vorkommenden Muscarin und dessen synthetischem Razemat zu vergleichen.

An mit Dial-Nembutal i. p. narkotisierten *Katzen* wurden Blutdruck, Atmung, Muskelzuckungen nach Reizung des motorischen Nerven und Nickhautkontraktionen durch präganglionäre Sympathikusreizung registriert. Damit konnte die intravenöse Wirksamkeit der leicht wasserlöslichen Muscarinisomeren gleichzeitig auf verschiedene Synapsen (peripher parasympathisch, ganglionär sympathisch, Muskelendplatten und Chemorezeptoren des Glomus caroticum) untersucht werden.

Das Ergebnis (Tabelle II) zeigt die ausserordentlich selektive Wirkung des natürlichen Muscarins und seines Razemats. Die Reihenfolge der Aktivitäten der verschiedenen Isomeren (Muscarin, Epiallo-Muscarin, Allo-Muscarin, Epi-Muscarin) ist für verschiedene Effekte, wie Blutdrucksenkung, spontane Nickhautkontraktion und Atmungsanregung gleich. Ganglienblockade und curareartige Lähmung der Skelettmuskulatur fehlen bei Dosen von 1–10 mg/kg Körpergewicht. Die peripher cholinergischen Synapsen sind bei allen Isomeren wie beim Muscarin gegenüber den ganglionären und besonders den Endplatten bevorzugt.

Muscaron und 4,5-Dehydromuscaron sind in dieser Hinsicht von Muscarin ganz verschieden. Sie wirken deutlich stärker cholinergisch als Muscarin oder Acetylcholin. Schon mit relativ kleinen Dosen (20 µg/kg) wird bei atropinisierten Tieren das sympathische Ganglion cervicale superius teilweise blockiert, und mit wenig grösseren Mengen (30–50 µg/kg) folgt nach starken fasciculären Zuckungen eine depolarisierende Lähmung der Endplatten, welche durch Prostigmin verstärkt wird. Die Muscarone gleichen daher nicht nur in ihrer Konstitution, sondern auch in ihrer Wirkung viel mehr dem Acetylcholin als das Muscarin. Da es sich aber nicht um Ester handelt, die durch Cholinesterase leicht gespalten werden, ist der Effekt bei intravenöser Injektion stärker als mit Acetylcholin.

Die Prüfung der Muscarin-Verbindungen erfolgte auch mit isolierten *Froschorganen*, bei denen die minimale Dosis zur Verminderung der Herzamplitude um $^1/_4$ mit Herzschlagverlangsamung und zur submaximalen Kontraktion des Musculus rectus abdominis, verglichen mit Acetylcholin und Muscarin, festgestellt wurde.

Das Ergebnis dieser Versuche (Tabelle I) bestätigt die bei Katzen gewonnenen Resultate. Die Muscarinisomeren sind viel weniger cholinergisch wirksam als natürliches Muscarin und ohne Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur. Dagegen sind die Muscarone stark cholinergisch und auch nikotinisch wirksam und übertreffen beim Skelettmuskel das Acetylcholin.

Tabelle I
Wirksamkeit bei isolierten Froschorganen
(µg/ml Perfusions- oder Badflüssigkeit)

	Herz, 1/4 Lähmung (muscarinisch)	Musc. rectus, submax. Kontraktion (nikotinisch)	Quotient nikotinisch/muscarinisch
(+)-Muscarin-J	0,018	> 500	>30000
d,l-Muscarin-J	0,032	> 500	>20000
(+)-Nor-Muscarin-HCl	5,0	—	—
d,l-Epi-Muscarin-J	214	>1000	> 5
d,l-Allo-Muscarin-J	15	>1000	> 65
d,l-Epiallo-Muscarin-J	12	> 500	> 40
Acetylcholin-Cl	0,002	5,0	2500
(–)-Muscaron-J	0,0075	2,5	330
d,l-Muscaron-J	0,01	2,5	250
d,l-Allo-Muscarin-J	0,02	1,5	75
d,l-Dehydro-Muscaron-J	0,01	0,9	90

Man kann durch Vergleichen der Wirkungsstärken die günstigste Stellung und gegenseitige Beziehung der pharmophoren Gruppen und damit die Molekülform angeben, die am cholinergischen Rezeptor vorliegt und am besten auf diesen passt (Abb.). Für Acetylcholin selbst ist dies nicht möglich, da das Molekül infolge freier Dreharbeit aller Kettenbindungen unendlich viele Formen annehmen kann.

Nach der Wirksamkeitstabelle ist jede *cis*-Stellung zwischen Hydroxyl- und Methyl- oder Methyltrimethylammongruppe mit einem mindestens 100fachen Aktivitätsverlust (Blutdrucksenkung) verbunden. Die Abnahme ist beim Epi-Muscarin, bei dem alle 3 Substituenten auf der gleichen Seite der Ringebene stehen, am stärksten, beim Allo-Muscarin mit *cis*-Stellung des grossen kationischen Kopfes mit der Oxygruppe etwas kleiner und beim Epiallo-Muscarin mit *cis*-Stellung der kleineren Methylgruppe am geringsten. Dies deutet auf eine sterische Behinderung der pharmophoren Funktion der Oxygruppe hin. Die Behinde-

[1] C. H. Eugster und P. G. Waser, Exper. *10*, 298 (1954); Helv. chim. Acta *40*, 888 (1957). – C. H. Eugster, Helv. chim. Acta *39*, 1002, 1023 (1956). – F. Kögl, C. A. Salemink, H. Schouten und F. Jellinek, Rec. Trav. chim. *76*, 109 (1957).

[2] E. Hardegger und F. Lohse, Helv. chim. Acta *40*, 2383 (1957). – H. C. Cox, E. Hardegger, F. Kögl, P. Liechti, F. Lohse und C. A. Salemink, Helv. chim. Acta *41*, 229 (1958).

[3] C. H. Eugster, Helv. chim. Acta *40*, 2462 (1957). – C. H. Eugster, F. Häfliger, R. Denss und E. Girod, Helv. chim. Acta *41*, 205, 583, 705, 886 (1958).

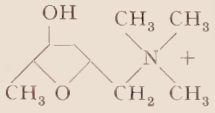
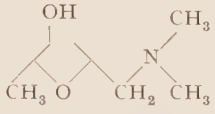
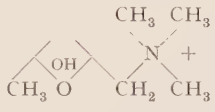
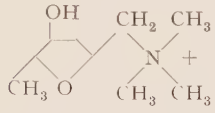
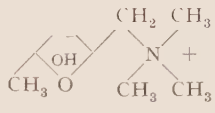
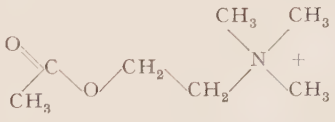
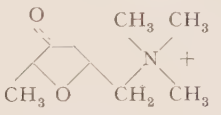
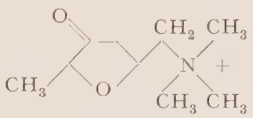
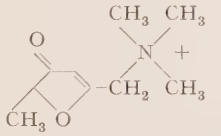
[4] C. C. Kuenzle und P. G. Waser, Helv. physiol. Acta *16*, 44 (1958).

[5] P. G. Waser, Exper. *11*, 462 (1955). H. Konzett und P. G. Waser, Helv. physiol. Acta *14*, 202 (1956).

[6] P. G. Waser, Schweiz. med. Wschr. *87*, 577 (1957).

[7] Zur Unterscheidung von anderen Rezeptoren (Chemorezeptor, Barorezeptor, usw.) soll der Begriff des Pharmorezeptors eingeführt werden.

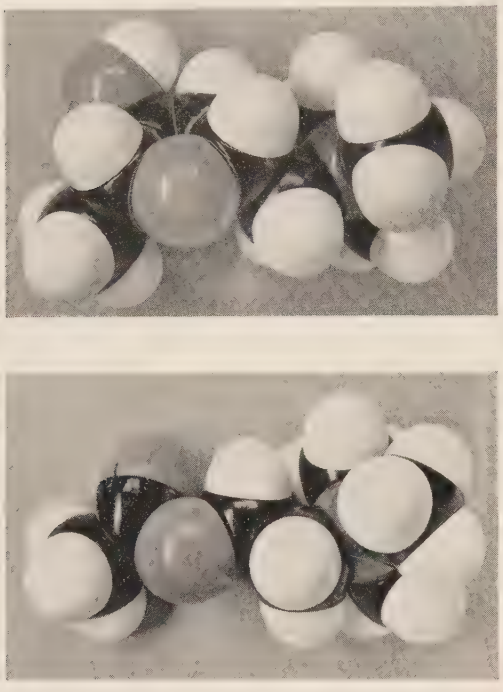
Tabelle II
Wirksamkeit bei Katzen intravenös (Minimaldosen µg/kg)

	Nicht atropinisiert:				Atropinisiert:		Wirkungsindex bezogen auf Blutdruck
	Blutdrucksenkung	Atmungsverstärkung	Nickhautkontraktion	Salivation	Ganglionblock	Muskellähmung	
(+)-Muscarin-J (natürliche Form) 	0,004	0,02	1,0	1,0	> 1000	> 1000	1
d,l-Muscarin-J (synthetisch)	0,01	0,05	1,2	2,0			2,5
(+)-Nor-Muscarin-HCl 	5,0	100	1000		>10000	>10000	1250
d,l-Epi-Muscarin-J 	3,0	20	250	200	8000	>10000	750
d,l-Allo-Muscarin-J 	1,7	20	125	250	>10000	>10000	420
d,l-Epiallo-Muscarin-J 	1,0	10	50		> 500	> 500	250
Acetylcholin-Cl 	0,01	1					2,5
(−)-Muscaron-J 	0,001	0,02	0,2	0,5	10	30	0,25
d,l-Muscaron-J	0,0015	0,03	0,2		20	40	0,3
d,l-Allo-Muscaron-J 	0,003	0,03	0,4	0,8	30	70	0,75
d,l-Dehydro-Muscaron-J 	0,0015	0,03	0,5	0,5	20	30	0,35

rung wird besonders deutlich, wenn man auch dem Äthersauerstoff eine pharmophore Funktion zuschreibt, indem dann Äther-O und Oxygruppe gleichzeitig möglichst nahe in Kontakt mit dem Rezeptor treten müssen. Jeder Substituent in *cis* zur Oxygruppe wird eine gleichzeitige Bindung der beiden pharmophoren Gruppen, abhängig von seiner Grösse, behindern.

Unsere Versuche zeigen daher, dass für die Muscarinwirkung Oxygruppe und Äthersauerstoff wesentlich sind. Ähnlich werden beim Muscaron und Acetylcholin die Carbonylgruppe (an Stelle der Oxygruppe) und der Äthersauerstoff an den Rezeptor gebunden, wodurch anscheinend die Selektivität bedeutend vermindert wird, indem zusätzlich ganglionäre und neuromuskuläre Syn-

apsen erregt und später blockiert werden. Für die Wirkung ist weiterhin die quartäre Trimethylammoniumgruppe, deren wirkungsverstärkender Einfluss beim tertiären Normuscarin fehlt (Tabelle II), absolut notwendig.



Stuartmodelle des natürlichen (+)-Muscarins (oben) und des Acetylcholins (unten).

Der kationische Stickstoff kann weder beim Acetylcholin noch beim Muscarin mit den beiden ersten pharmophoren Gruppen in eine gemeinsame Kontaktebene gebracht werden, da hier die N-Methylgruppen sterisch hindern. Dass mindestens 3 am Rezeptor haftende Gruppen notwendig sind, beweist auch die eindeutige Wirkungsspezifität der Antipoden, von denen nur eine der beiden Formen gleichzeitig mit 3 entsprechenden Receptorpunkten in Verbindung treten kann. Bei dem bis dahin untersuchten Muscarin ist die natürliche Form doppelt so wirksam wie das Racemat (*d,l*-Muscarin). (−)-Muscarin hat dementsprechend höchstens einige Prozent der Wirksamkeit des (+)-Muscarins[3]. Es ist anzunehmen, dass für die Antipoden der übrigen Stereoisomeren ähnliche Unterschiede existieren. Nur die untersuchten Muscarone scheinen in ihrer Wirkung wenig stereospezifisch zu sein.

Auch die Molekülgrösse spielt für die Wirkung eine bedeutende Rolle. Eine Vergrösserung des Ringes oder eine Verlängerung der «Acetylcholinkette»[8] vermindert die Aktivität bedeutend. Vielleicht ist auch die viel weniger selektive Wirkung des Muscarons Folge der etwas kleineren Molekülgrösse. Aus diesen Gründen muss man erneut schliessen, dass die Rezeptorgegend räumliche Form hat und nicht einfach planar gebaut ist[6].

Muscarin besitzt damit 3 nachgewiesene pharmophore Gruppen, deren Stellung im Molekül wenigstens für 2 definiert ist. Das gleiche gilt auch für Acetylcholin, und alle Vorschläge für den Bau des cholinergischen Rezeptors werden darauf Rücksicht nehmen müssen.

[8] P. G. Waser und C. H. Eugster, in Vorbereitung.

Für die Unterstützung dieser Arbeit danken wir der Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz, sowie Herrn PD. Dr. C. H. Eugster, Universität Zürich, und Herrn Dr. F. Häfliger der J. R. Geigy AG., Basel für die Überlassung der Muscarinverbindungen.

P. G. Waser

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, 25. Juni 1958.

Summary

All synthetic isomers of (+)-muscarine, the racemic forms of epi-muscarine, allo-muscarine, and epiallo-muscarine are at least 100 times less potent on blood pressure of cats and isolated frog hearts than the natural alkaloid. Only muscarones are more potent and exhibit strong nicotinic action on the frog rectus and in blocking ganglionic and neuro-muscular transmission in the cat. They closely resemble acetylcholine in their structure and action.

The activity of the isomers depends on the position of the constituents on the tetrahydrofurane ring. Steric hindrance of the hydroxy or carbonylgroup and of ether-oxygen plays an important part in the contact with the cholinergic receptor. As nor-muscarine without the quarternary nitrogen is inactive, at least 3 different points of contact have to be considered. This is stressed by the fact that muscarine is highly stereospecific in its action, whereas muscarone is not.

Sul meccanismo della eptoformazione non ossidativa nel muscolo scheletrico

In una precedente nota[1] abbiamo riferito sulla eptoformazione non ossidativa a partire da glucoso-6-fosfato (G-6-P) e da fruttoso-6-fosfato (F-6-P), in estratti di muscolo scheletrico di ratto (trattati con carbone per eliminare i nucleotidi, presenti in forte concentrazione, e tra questi l'ATP, il TPN e il DPN).

Circa il meccanismo di tale eptoformazione, si poteva ammettere – come suggerito da Bonsignore[2] – che essa fosse dovuta a reazioni transaldolasiche e transchetolasiche, tra il substrato aggiunto (G-6-P o F-6-P), e un metabolita (per esempio trioso-fosfato), presente già in tracce nell'estratto, e rigenerantesi nel corso delle reazioni stesse di interconversione glicidica. La concentrazione di questo metabolita (trioso-fosfato), nell'estratto, sarebbe stato quindi fattore limitante della modica eptoformazione verificatasi.

Per suffragare questa ipotesi, abbiamo pensato di vedere se si aveva un aumento della eptoformazione aumentando la concentrazione del trioso-fosfato. A tale scopo, abbiamo aggiunto alle nostre prove enzimatiche il fruttoso-1,6-difosfato (F-1,6-P)[3], il quale, per azione aldolasica, si sarebbe scisso in trioso-fosfati. Questi, d'altra parte, nelle nostre condizioni, non potevano essere sottratti alla eptoformazione dalla via glicolitica, perchè impediti dalla mancanza di DPN (adsorbito dal carbone) e dalla presenza di acido monoiodoacetico, inibitore della trioso-fosfato-deidrasi.

[1] V. Moret e S. Sperti, Exper. *14*, 309 (1958).

[2] A. Bonsignore, S. Pontremoli, G. Fornaini e E. Grazi, G. Biochimica *6*, 241 (1957).

[3] Nelle nostre prove, il F-1, 6-P non poteva formarsi per azione fosfochinasica a partire da F-6-P (o G-6-P), a causa della mancanza di ATP nel mezzo.

Il metodo di preparazione dell'estratto, le condizioni sperimentali seguite nelle prove enzimatiche, e i metodi di dosaggio, sono descritti nella nota precedente[1]. L'unica variante era costituita dall'aggiunta del F-1,6-P alle prove enzimatiche contenenti il G-6-P (o il F-6-P). Prove enzimatiche di controllo contenevano il solo F-1,6-P. I risultati medi ottenuti da diverse esperienze sono riassunti nella Tabella.

Tabella

Substrato	μM eptoso/mg N_2 proteico
7,5 μM glucoso-6-P	0,15
7,5 μM glucoso-6-P + 1,8 μM fruttoso-1,6-P	0,56
1,8 μM fruttoso-1,6-P	0,12

Come si vede, nelle prove enzimatiche contenenti il G-6-P insieme al F-1,6-P, si aveva la formazione di un numero di μM di eptoso molto superiore alla somma dei valori ottenuti nelle due prove in cui era presente singolarmente uno solo dei due substrati[4].

Questa maggiore eptoformazione, a nostro parere, suffragherebbe l'ipotesi fatta precedentemente. I risultati ottenuti sono infatti facilmente interpretabili ammettendo che il meccanismo della eptoformazione sia identico in tutte e tre le prove. Esso potrebbe essere molto succintamente così schematizzato:

Secondo lo schema, per la eptoformazione sarebbero necessari sia l'esoso-6-fosfato quanto il trioso.

Nelle nostre condizioni sperimentali, nelle prove in cui era presente il solo G-6-P, la velocità di eptoformazione sarebbe stata limitata dalle tracce di trioso-fosfato presenti nell'estratto; nelle prove in cui era presente il solo F-1,6-P, il processo sarebbe stato limitato dalla quantità di F-6-P derivato, durante l'incubazione, per idrolisi del F-1,6-P a livello del legame fosforico in posizione 1[5].– Nelle prove infine in cui erano presenti insieme ambedue i substrati, G-6-P e F-1,6-P, la velocità di eptoformazione sarebbe stata evidentemente molto maggiore, in quanto sarebbe aumentato di concentrazione il substrato che faceva da fattore limitante nel caso della eptoformazione a partire da G-6-P o da F-1,6-P separatamente.

S. Sperti e V. Moret

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, 12 Luglio 1958.

Summary

F-1,6-P has been shown to increase the rate of 'non-oxydative heptoformation' from glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate in enzymatic preparations of rat skeletal muscle. The mechanism of this increase – probably due to triose-phosphate, formed by aldolase action on F-1,6-P – is discussed.

[4] Lo stesso aumento, per quanto minore, si verificava anche nelle prove in cui, accanto al F-1, 6-P, il G-6-P era sostituito dal F-6-P. Infatti, in presenza di 7,5 μM di F-6-P + 1,8 μM di F-1,6-P, si formavano 0,42 μM di eptoso/mg di N_2 proteico; in presenza invece delle sole 7,5 μM di F-6-P, se ne formavano 0,19 μM.

[5] L'idrolisi del F-1,6-P è stata constatata dosando i fosfati liberi nel mezzo, prima e dopo l'incubazione, con il metodo di Berenblum e Chain[6]. Tale idrolisi si svolgeva soltanto a livello del legame fosforico in posizione 1. Infatti, come avevamo precedentemente constatato[1], durante l'incubazione non si aveva alcuna idrolisi del legame fosforico in posizione 6 del G-6-P e del F-6-P.

L'idrolisi del legame fosforico in posizione 1 del F-1,6-P, come abbiamo potuto constatare in prove enzimatiche a parte, veniva molto aumentata dall'aggiunta di Mg^{++}, il quale, come è noto, attiva la F-1,6-P-asi del muscolo scheletrico[7].

Traccie di F-6-P erano d'altra parte già inizialmente presenti nel preparato commerciale di F-1,6-P da noi usato (NBCo), come è stato constatato mediante l'analisi elettroforetica su carta[8].

[6] I. Berenblum e E. Chain, Biochem. J. *32*, 295 (1938).

[7] K. Lohmann, Biochem. Z. *262*, 137 (1933).

[8] H. E. Wade e D. M. Morgan, Biochem. J. *60*, 264 (1955).

Sulla biochimica della fermentazione citrica da parte dell'*Aspergillus niger*

II°. Attività aspartico-glutamico transaminasica

In un lavoro precedente[1] abbiamo osservato che quando un ceppo selezionato di *Asp. niger* veniva coltivato (coltura superficiale) per circa 30 ore in un terreno carente di azoto (Bernhauer) in cui si aveva accumulo di acido citrico, il rapporto tra la sua attività succino-deidrasica e quella «citrico-deidrasica» era molto maggiore rispetto a quello che si aveva allorchè la stessa muffa veniva coltivata in un terreno completo (Raulin) in cui l'acido citrico non si accumulava.

Questa osservazione suffragava l'ipotesi che nel nostro ceppo di *Asp. niger* potesse esser operante il ciclo tricarbossilico di Krebs e che l'accumulo di acido citrico, che si verificava allorchè tale ceppo veniva coltivato in terreno di Bernhauer, fosse dovuto ad una deficiente attività «citricodeidrasica».

Questo meccanismo non poteva però, da solo, spiegare il fatto che l'accumulo di acido citrico, durante la coltura del ceppo nello stesso terreno di Bernhauer, aumentasse via via nel tempo in modo ben superiore a quello imputabile all'accrescimento della massa miceliare. D'altra parte abbiamo osservato che, coll'aumentare del tempo di coltura in Bernhauer, diminuiva nel micelio dell'*Asp. niger* l'attività succino-deidrogenasica. Questo, a nostro parere, indicava che via via nel tempo diminuiva la velocità di rifornimento dell'acido ossalacetico, sia attraverso il ciclo tricarbossilico, sia anche attraverso il ciclo bicarbossilico eventualmente presente, perchè la deidrogenazione dell'acido succinico è una delle tappe obbligatorie, in ambedue i cicli, per la formazione dell'acido ossalacetico.

Essendo d'altra parte quest'ultimo il necessario precursore per la biosintesi dell'acido citrico (com'è stato dimostrato da vari autori[2]), bisognava pensare che nel nostro ceppo sussistesse un altro meccanismo enzimatico, fornente acido ossalacetico, la cui attività aumentasse durante il tempo di coltura (30–48 h) in cui si verificava l'accumulo di acido citrico.

Nella ricerca oggetto di questa nota, abbiamo rivolto la nostra attenzione all'attività aspartico-glutamico transaminasica.

[1] V. Moret e M. Lorini, Rend. Acc. Naz. Lincei *23*, 77 (1957).

[2] K. F. Lewis e S. Weinhouse, J. Amer. chem. Soc. *73*, 2500 (1951). – W. W. Cleland e M. J. Johnson, J. Biol. Chem. *208*, 679 (1954). – E. B. Chain, Proc. 3° Cong. Int. Biochem. Bruxelles, 523 (1955).

Attività succino-deidrasica		Attività aspartico-glutamico transaminasica		Acido citrico accumulato nel mezzo colturale (mg)	
30 h	48 h	30 h	48 h	30 h	48 h
8,0	4,8	33,2	38,5	3,4	130
13,5	6,5	25,1	30,5	6,3	156
7,8	3,0	40,2	29,0	4,8	211
9,4	3,6	46,8	42,8	3,1	204
11,3	3,7	24,3	26,5	3,9	177
media: 10,0	4,4	33,9	33,4	4,3	175

Le condizioni ambientali di coltura (superficiale) del ceppo di *Asp. niger* in terreno di Bernhauer e la preparazione dell'estratto enzimatico acellulare, sono quelle descritte nella nota precedente[1].

Le determinazioni venivano eseguite negli estratti dei due miceli ottenuti, dopo 30 h e dopo 48 h, dagli inoculi fatti con la stessa sospensione di spore, in modo che i valori ottenuti nei due tempi diversi fossero direttamente confrontabili, e non influenzati dalla diversità delle spore di volta in volta inoculate nella serie di esperienze.

L'attività succino-deidrogenasica veniva determinata misurando manometricamente al Warburg il consumo di O_2 in presenza di bleu di metilene come trasportatore autossidabile di idrogeno.

L'attività aspartico-glutamico transaminasica veniva determinata col metodo di Tonhazy e coll.[3], dosando l'acido piruvico derivato per decarbossilazione chimica dall'acido ossalacetico formatosi durante la transaminazione[4]. Tale dosaggio dell'acido piruvico (o, più precisamente, del suo dinitrofenil-idrazone) nell'estratto toluolico finale veniva eseguito sia direttamente a $\lambda = 540$ mμ (previa alcalinizzazione con KOH alcoolica), sia trattando l'estratto toluolico con Na_2CO_3 15% e NaOH 1,5 N e facendo due letture al Beckman, una a $\lambda = 412$ mμ e l'altra a 440 mμ, secondo il metodo proposto da Goodwin e Williams[5].

L'acido citrico veniva dosato col metodo di Saffran[6].

Nella tabella sono esposti i valori dell'attività succino-deidrogenasica (espressa in μl O_2/mg di N proteico in 20 min) e dell'attività transaminasica (espressa in μ*M* di acido ossalacetico/mg di N proteico in 10 min) determinate nei miceli dopo 30 h e dopo 48 h di coltura in terreno di Bernhauer.

I risultati ottenuti dimostrano che nell'intervallo di tempo 30–48 h, contemporaneamente ad un maggiore accumulo di acido citrico nel mezzo colturale, l'attività succino-deidrogenasica della muffa diminuiva e l'attività aspartico-glutamico transaminasica rimaneva praticamente costante.

A nostro parere quindi, la maggior formazione di acido ossalacetico necessaria per l'accumulo via via maggiore di acido citrico non può esser spiegata completamente nè dall'attività transaminasica, nè attraverso un meccanismo ciclico tricarbossilico o bicarbossilico eventualmente presente.

V. Moret e M. Lorini

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, 21 luglio 1958.

[3] N. E. Tonhazy, N. G. White e W. W. Umbreit, Arch. Biochem. *28*, 36 (1950).

[4] Per questa determinazione l'estratto enzimatico veniva preparato in tampone fosfati potassici *M*/10 pH = 7,4.

[5] T. W. Goodwin e G. R. Williams, Biochem. J. *51*, 708 (1952).

[6] M. Saffran e O. F. Deustedt, J. biol. Chem. *175*, 849 (1948).

Summary

In a strain of *Asp. niger* grown in Bernhauer medium, succinic-dehydrogenase activity decreased and aspartic-glutamic transaminase activity remained practically constant, while citric acid accumulated in the medium.

The Free Amino Acid Contents and Growth Rates of Polyploid *Saccharomyces*

Studies by Spiegelman *et al.*[1] have suggested that haploid strains of *Saccharomyces* may possess twice the cellular free amino acid content of diploid strains. Such an indication is particularly provocative in two respects. First, in view of the established relationship between the quantity of the cellular free amino acid pool and the rate of protein synthesis[2], it suggests the possibility of a ploidy dependent differential growth rate in yeasts. Direct information on this point has been scant and contradictory. Bauch[3], for example, has reported that polyploidization diminishes the growth rate of yeasts while Winge and Roberts[4] have maintained that the reverse is true. Second, of the numerous biochemical[5], biophysical[6] and morphological[7] parameters defining ploidy in *Saccharomyces*, cellular free amino acid contents would be the first to show an inverse relationship to the level of polyploidy. This has crucial diagnostic significance since the absence of convincing cytogenetic information coupled with the extraordinarily cumbersome techniques of polyploid genetic analysis have recommended such parameters as the most rapid and reliable means for the precise identification of polyploidy in yeasts[8] and other microorganisms as well[9]. Accordingly, the present study was undertaken to obtain definitive information concern-

[1] S. Spiegelman, H. O. Halvorson, and R. Ben-Ishai, *Amino Acid Metabolism* (W. McElroy and B. Glass, Johns Hopkins, Baltimore 1955), p. 124.

[2] H. O. Halvorson and S. Spiegelman, J. Bacteriol. *65*, 496 (1953).

[3] R. Bauch, Naturw. *29*, 503 (1941).

[4] O. Winge and C. Roberts, *The Chemistry and Biology of Yeasts* (A. H. Cook, Academic Press, New York 1958), p. 93.

[5] M. Ogur, Arch. Biochem. and Biophys. *53*, 484 (1954); J. Bacteriol. *69*; 159 (1955). – M. Ogur, S. Minckler, G. Lindegren and C. Lindegren, Arch. Biochem. and Biophys. *40*, 175 (1952).

[6] W. H. Lucke and A. Sarachek, Nature *171*, 1014 (1953). – A. Sarachek, Cytologia *19*, 77 (1954).

[7] B. D. Mundkur, Exper. *9*, 373 (1953). – G. F. Townsend and C. C. Lindegren, J. Bacteriol. *67*, 480 (1954).

[8] C. C. Lindegren, G. Lindegren, R. B. Drysdale, J. P. Hughes, and A. Brenes-Pomales, Genetica *28*, 1 (1956).

[9] J. B. Clark and R. B. Webb, J. Bacteriol. *70*, 454 (1955). – J. E. Ogg and M. R. Zelle, J. Bacteriol. *74*, 477 (1957).

Strains	Free Amino Acid Contents				Dry Weights Per Cell $\times 10^{-5}\mu g$ ($\pm$ 1 s. e.; 4 determinations)	Generation Times in min** ($\pm$ 1 s. e.; 5 determinations)
	in μg per mg dry weight ($\pm$ 1 s. e; 4 determinations)		in μg per 10^7 cells*			
	Glutamic Acid	Aspartic Acid	Glutamic Acid	Aspartic Acid		
Haploids						
16	20·7 $\pm$ 0·75	2·56 $\pm$ 0·24	2·73	0·338	1·32 $\pm$ 0·05	117 $\pm$ 2
26	18·6 $\pm$ 0·46	2·62 $\pm$ 0·39	2·31	0·325	1·24 $\pm$ 0·04	115 $\pm$ 2
13778	15·7 $\pm$ 0·68	2·39 $\pm$ 0·25	1·82	0·277	1·16 $\pm$ 0·04	121 $\pm$ 2
Diploids						
16 $\times$ 26	20·4 $\pm$ 0·90	2·81 $\pm$ 0·49	5·37	0·741	2·64 $\pm$ 0·09	118 $\pm$ 2
11294	16·9 $\pm$ 0·99	2·31 $\pm$ 0·16	3·90	0·534	2·31 $\pm$ 0·09	119 $\pm$ 3
11296PI	16·9 $\pm$ 0·46	2·85 $\pm$ 0·26	3·42	0·575	2·22 $\pm$ 0·07	122 $\pm$ 2
13778 $\times$ 26 . .	19·1 $\pm$ 0·68	2·65 $\pm$ 0·48	5·35	0·742	2·80 $\pm$ 0·08	116 $\pm$ 2
Triploids						
16 $\times$ 11294 . .	20·3 $\pm$ 0·77	2·54 $\pm$ 0·28	7·86	0·984	3·87 $\pm$ 0·07	117 $\pm$ 2
26 $\times$ 11296PI .	21·8 $\pm$ 0·98	2·88 $\pm$ 0·29	7·22	0·954	3·31 $\pm$ 0·10	117 $\pm$ 1
13778 $\times$ 11294 .	19·9 $\pm$ 0·72	2·55 $\pm$ 0·11	7·08	0·908	3·56 $\pm$ 0·09	118 $\pm$ 2
Tetraploid						
11294 $\times$ 11296PI	23·0 $\pm$ 1·4	2·58 $\pm$ 0·20	9·89	1·11	4·30 $\pm$ 0·10	116 $\pm$ 2

* These values were computed from those given in the second, third, and sixth columns.

** Generation times were computed according to the formula: $G = \frac{\text{time}_2 \cdot \text{time}_1}{3 \cdot 32 \log \left(\frac{\text{cell number at time}_2}{\text{cell number at time}_1} \right)}$.

ing the relationship between free amino acid pool levels, growth rates and ploidy in a genetically established family of haploid, diploid, triploid and tetraploid *Saccharomyces*.

The strains employed were members, or were derived directly from members, of Lindegren's original family of polyploid *Saccharomyces*[10]; all were prototrophic and possessed comparable respiratory activities. Growth rates were determined from haemocytometer counts of cells growing during log phase in shake cultures at 28° C upon a synthetic medium[11]. The magnitudes of the free amino acid pools of log phase cells were estimated by their glutamic and aspartic acid contents. The pools were collected according to the method of Halvorson and Spiegelman[12] and their glutamic and aspartic acid components were individually isolated by one dimensional ascending paper chromatography on Whatman no. 1 paper, using water saturated phenol containing 40 mg per cent of 8-hydroxyquinoline as the developing solvent. The amino acids were identified and quantitatively estimated according to the method of Naftalin[13]. For dry weight measurements, cells were washed three times with cold distilled water and dried for 20 to 24 hours at 85° C; dry weights per cell were computed from haemocytometer counts of aliquots removed from washed cell suspensions prior to drying.

The findings are summarized in the table. When comparisons were made upon an equivalent dry weight basis, only slight variations in the quantities of free amino acids were detected between strains and no strain differences specifically dependent upon ploidy were apparent. However, since dry weights per cell were found to increase integrally with increasing polyploidy, upon converting from a dry weight to a cellular basis for comparison, the free amino acid values assumed a corresponding integral increase with increasing polyploidy. Though these findings disagree with the indications obtained by Spiegelman *et al.*, they are consistent with other reported biochemical characteristics of polyploid *Saccharomyces*.

Measurements of growth rates showed that generation times are independent of ploidy. This is compatible with the pool and cell weight data to the extent that the integral relationship between cell mass and ploidy would necessitate the proportionate relationship between amino acid protein precursors and ploidy in order for cells of different levels of polyploidy to maintain equivalent division rates.

Thus, these studies offer the extent of the cellular free amino acid content as one more criterion for identification of polyploidy in *Saccharomyces* in the absence of convenient genetic procedures. In addition they show that the polyploid state exerts neither a debilitating nor an invigorating effect upon the division rate of the individual yeast cell. In terms of population dynamics, however, the demonstrated ploidy dependence of cell mass coupled with the ploidy independence of generation time does imply a selective advantage favoring highly polyploid individuals when competing in mixed culture with cells of lower degrees of ploidy.

[10] C. C. Lindegren and G. Lindegren, J. gen. Microbiol. *5*, 885 (1951).

[11] The culture medium was of the following composition: ammonium tartrate, 4 g; KH_2PO_4, 1·5 g; K_2HPO_4, 0·5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0·5 g; $CaCl_2$, 0·33 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0·5 mg; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0·8 mg; $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0·15 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0·9 mg; inositol, 10 mg; thiamin, pyridoxine, nicotinic acid, paraminobenzoic acid, calcium pantothenate, 600 μg each; biotin, 10 μg and distilled water, 1000 ml.

[12] H. O. Halvorson and S. Spiegelman, J. Bacteriol. *64*, 207 (1952).

[13] L. Naftalin, Nature *161*, 763 (1948).

This work was performed during the tenure of a Postdoctoral Fellowship at the Institute of Microbiology supported by a grant from the Rockefeller Institute to Prof. Walter J. Nickerson.

A. Sarachek*

Institute of Microbiology, Rutgers – the State University, New Jersey, July 23, 1958.

Zusammenfassung

In einer genetisch nachweisbar polyploiden Familie von Saccharomyces wurden der Gesamtgehalt an freien intrazellulären Aminosäuren und die Geschwindigkeit der Zellteilungen in Abhängigkeit der Ploidie bestimmt. Es liess sich zeigen, dass die Geschwindigkeit der Zellteilungen von der Ploidie nicht beeinflusst wird, während der Gesamtgehalt an freien intrazellulären Aminosäuren sich direkt proportional mit der Zunahme der Ploidie vergrössert (Verhältnis 1:1).

* Present address: Department of Biology, University of Wichita, Wichita, Kansas.

Verteilungskoeffizient und bakterizide Wirkung von Phenolen und aromatischen Alkoholen

Die Bedeutung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Zellipoiden (Cytoplasmamembran) und wässriger Phase für die Wirksamkeit eines Arzneimittels wurde vielfach dargelegt und findet in neuerer Zeit wieder vermehrte Beachtung[1]. Nur von wenigen Autoren ist diese Denkweise konsequent auch bei der Einwirkung von Desinfektionsmitteln auf Bakterien angewandt worden[2,3,4,5], obgleich in homologen Serien (bei Phenolen, Alkoholen u. a.) den bakteriziden Wirkungen gewisse Stoffeigenschaften in auffälliger Weise parallel laufen: Wasserlöslichkeit, Erniedrigung der Oberflächenspannung, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient (Konzentration in lipophiler Phase/Konzentration in Wasser)[2].

Bei Abtötungsversuchen an Bakterien stellten wir ganz allgemein fest[6], dass von den geprüften Phenolen und aromatischen Alkoholen um so geringere Konzentrationen zur Erreichung eines bestimmten Mortalitätsgrades nötig waren, je geringer die Wasserlöslichkeit einer Verbindung war. Damit kamen wir vorerst zum gleichen Resultat wie Ferguson[2]. Dieser bezeichnete den Quotienten

$$\frac{\text{geprüfte, molare Konzentration}}{\text{Wasserlöslichkeit in mol}}$$

als (thermodynamische) Aktivität und zeigte am Beispiel der Alkohole (Methyl- bis Octyl-), dass trotz sehr verschiedenen geprüften Konzentrationen die Aktivitäten ungefähr gleich waren. Allawala und Riegelman[3] kamen bei der Untersuchung einer grösseren Reihe von Phenolen zum gleichen Schluss.

Besonders aufschlussreich zeigten sich bei der Prüfung die aromatischen Alkohole. Erwartungsgemäss stellten wir folgende Wirkungssteigerung fest:

Benzylalkohol < β-Phenylaethylalkohol < γ-Phenylpropylalkohol. Neben dieser Verlängerung der Seitenkette suchten wir auch mit Hilfe von Kernsubstitution zu wirksameren Verbindungen zu kommen und stellten p-Chlorbenzylalkohol und p-Chlor-β-phenylaethylalkohol dar. Die beiden chlorierten Alkohole und γ-Phenylpropylalkohol sind unseres Wissens noch nicht auf ihre bakterizide Wirkung geprüft worden. Bei diesen chlorierten Alkoholen fanden wir nun, dass die Wirksamkeit sich nicht, wie eigentlich zu erwarten gewesen wäre, umgekehrt proportional zur Wasserlöslichkeit verhielt. So erzielten wir zum Beispiel mit einer 0,3% (0,021 mol) -Lösung von p-Chlorbenzylalkohol (Wasserlöslichkeit bei + 3°C = 0,021 mol) einen gleichen Mortalitätsgrad wie mit einer 0,2%-Lösung (0,013 mol) von p-Chlor-β-phenylaethylalkohol (Wasserlöslichkeit = 0,0294 mol). Die nach Ferguson berechneten Aktivitäten stimmen somit nicht überein: p-Chlorbenzylalkohol = 1,0, p-Chlor-β-phenylaethylalkohol = 0,44. Mit Hilfe der Verteilung zwischen Wasser und Hexan als lipoider Phase konnte das Problem jedoch gelöst werden. Die erwähnten, gleich stark bakterizid wirkenden Konzentrationen ergaben nach der Verteilung folgendes Bild (s. Tabelle).

Die bei der Verteilung zwischen Wasser und Hexan vom letzteren aufgenommenen Mengen sind also annähernd gleich. Ähnliche Zusammenhänge ergaben die Prüfungen von Phenolen: Von substituierten Monophenolen und Monoäthern von Diphenolen, die gleiche Wasserlöslichkeit besitzen, sind die Monophenole dank besserem Verteilungskoeffizienten wirksamer. Richardson und Reid[4] kamen bei α-ω-Di-p-hydroxyphenylalkanen und Shukis und Tallman[5] bei aliphatischen Hg-Verbindungen ebenfalls zur Ansicht, dass der Verteilungskoeffizient von ausschlaggebendem Einfluss auf die bakterizide Wirksamkeit ist.

Auf Grund dieser Resultate lässt sich die Regel aufstellen, dass *verschiedene, in wässriger Lösung vorhandene Konzentrationen von Phenolen und aromatischen Alkoholen eine gleiche bakterizide Wirkung ausüben, wenn bei der Verteilung zwischen Wasser und einer lipophilen Phase in der Lipoidphase gleiche molare Konzentrationen erhalten werden.* Diese Regel kann in erster Annäherung für die Bewertung von phenolischen und alkoholischen Desinfektionsmitteln gebraucht werden, indem wie folgt verfahren wird:

c_w sei die in wässriger Lösung vorgegebene Konzentration (in mol), c_L die Konzentration in der Lipoidphase nach der Verteilung. Den Quotienten c_w/c_L bezeichnen wir vorläufig als «Aktivitätsindex». Bei der Festlegung der lipoiden Phase ist die erhaltene Zahl für einen bestimmten Stoff immer gleich. Mit den «Aktivitätsindizes» als Stoffkonstanten werden nun die in wässriger Lösung vorgegebenen Konzentrationen c_w der zu vergleichenden Substanzen so lange geändert, bis gleiche Konzentrationen in der Lipoidphase erhalten werden. Die auf diese Weise errechneten, verschiedenen Konzentrationen der zum Vergleich stehenden Phenole oder aromatischen Alkohole werden eine ungefähr gleiche bakterizide Wirkung ausüben. Da das phenolische Hydroxyl auch gegenüber Bakterien reaktionsfähiger ist, können die Phenole und aromatischen Alkohole nicht in der gleichen Reihe behandelt werden. Da ferner Phenolat-Ionen nicht bakterizid wirken (dies wird durch unsere Versuche erneut bestätigt), müssen Phenole in undissoziierter Form vorliegen, bzw. es darf nur der undissoziierte Anteil berücksichtigt werden.

Bei den in Frage stehenden Verbindungen sind zwei Gesichtspunkte für die bakterizide Wirksamkeit massgebend:

[1] B. B. Brodie und C. A. M. Hogben, J. Pharm. Pharmacol. *9*, 345 (1957).

[2] J. Ferguson, Proc. Roy. Soc. London, *B 127*, 387 (1939).

[3] N. A. Allawala und S. Riegelman, J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. ed. *43*, 93 (1954).

[4] E. M. Richardson und E. E. Reid, J. Amer. chem. Soc. *62*, 413 (1940).

[5] A. J. Shukis und R. C. Tallman, J. Amer. chem. Soc. *65*, 2365 (1943).

[6] Wir bedienten uns der Membranfilter-Methode und arbeiteten meist im Mortalitätsbereich 99,9–99,999%, vgl. Diss. H. Hess, Basel 1958, in der sich die ausführlichen Resultate finden.

	Konzentration in		Verteilungs-koeffizient
	Wasser	Hexan	
p-Chlorbenzylalkohol	0,0105 mol	0,0106 mol	1,0
p-Chlor-β-phenylaethylalkohol	0,0037 mol	0,0091 mol	2,5

1) Die Wirkung steigt mit zunehmender Lipoidlöslichkeit.

2) Die Substanz muss in Wasser gelöst sein, damit die Moleküle überhaupt an die hydrophile Aussenschicht der Bakterienzelle gelangen können.

Aus diesen beiden, sich widersprechenden Punkten ergibt sich beim Anstieg in einer homologen Reihe folgende Situation: Bei der Überschreitung eines gewissen Verteilungskoeffizienten kann eine weitere Substitution im Kern oder eine weitere Verlängerung der Seitenkette die Lipoidlöslichkeit (gemessen am Verteilungsgleichgewicht) nur noch unwesentlich erhöhen. Gleichzeitig wird aber die Wasserlöslichkeit stärker erniedrigt. An dieser Stelle einer homologen Reihe muss ein Wirkungsabfall eintreten. Denn die zu geringe Wasserlöslichkeit der Verbindung erlaubt es nicht mehr, genügend Moleküle an die Grenzfläche der Zelle heranzubringen. Folglich ist es auch nicht mehr möglich, die gleiche Konzentration in den Zellipoiden zu erreichen, wie beim nächst niederen Homologen. Es hängt natürlich von der Resistenz der geprüften Bakterienart ab, bei welcher Verbindung einer homologen Reihe der Wirkungsabfall eintritt.

Diejenige Substanz wird also am besten wirken, die bei genügender Wasserlöslichkeit sich zum grössten Teil in der Lipoidphase anreichern kann. Als solche Verbindung kann der zu fast 0,5% in Wasser lösliche p-Chlor-β-phenylaethylalkohol bezeichnet werden, denn er erreicht bei der Verteilung zwischen Wasser und Hexan eine 3mal höhere Konzentration in der Lipoidphase. Dieser aromatische Alkohol dürfte deshalb als neues, bakterizides und wenig toxisches Mittel für viele Verwendungsmöglichkeiten geeignet sein (wie zum Beispiel für die Sterilhaltung oder Konservierung von Injektionslösungen). In der Phenolreihe zeigt p-Chlor-m-kresol ebenfalls ähnliche Eigenschaften bezüglich Wasserlöslichkeit und hohem Verteilungskoeffizienten zwischen lipophiler und wässriger Phase.

Unsere Abtötungsversuche, durchgeführt an mehreren grampositiven und gramnegativen Testbakterien, stützen somit auch die Hypothese einer Lipoidschranke[7] in der Grenzfläche der Bakterienzelle. Die Verwendung von Hexan zur Ermittlung des Verteilungsgleichgewichtes ist nur als grobes Modell zu betrachten.

H. Hess und P. Speiser

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel, 3. September 1958.

Summary

The rôle of the partition coefficient for the bactericidal efficiency of phenols and aromatic alcohols is stressed. It is postulated that these compounds in any concentration should have identical bactericidal effects if they attain the same molar concentration in a lipoid phase after distribution. It is proposed to use this postulate for a new approach to test phenolic and alcoholic disinfectants. p-chloro-β-phenetyl alcohol reveals a high bactericidal effect due to a favourable distribution coefficient combined with a water solubility of nearly 0·5%.

[7] P. Mitchell und J. Moyle, J. gen. Microbiol. *5*, 981 (1951).

Oxidative Phosphorylation and Nitrogen Fixation by Cell-Free Extracts of the Azotobacter

Several investigators (Slater, Tissieres and Slater, Rose, and Ochoa[1]) have demonstrated coupled oxidative phosphorylation by fractionated extracts of *Azotobacter vinelandii*. Hyndman *et al.*[2] using crude extracts of the same organism coupled phosphorylation with the oxidation of molecular hydrogen. Hartman, Brodie, and Gray[3] found that the addition of ATP and Mg^{++} stabilized the very labile oxidative phosphorylation system in sonic extracts of this organism. Some investigators have attributed the failure to obtain cell free preparations of the azotobacter that will consistently incorporate N_2^{15} to a lack of a readily available energy source. Therefore, the capability of a cell free preparation of *A. vinelandii O*, prepared by the method of Hartman, Brodie, and Gray[3], to fix N_2^{15} was determined.

Table I

Substrate	Oxygen μatoms	ΔPi μmoles	P/O ratio
Succinate . . .	7·3— 8·0	3·0—4·0	0·41—0·50
Fumarate . . .	8·5—10·0	3·1—4·5	0·36—0·45
α-Ketoglutarate	6·1— 7·1	2·9—4·4	0·47—0·61

Each flask contained 1·0 ml dialyzed cell extract (14 mg protein), 20 μmoles substrate, 12 μmoles phosphate, 25 μmoles NaF, 15 μmoles $MgCl_2$.
Acceptor system: 5 μmoles mannose + 3 mg hexokinase and 2·5 μmoles ADP. Gas phase: air. Incubation time: 10 minutes. ΔPi indicates inorganic phosphate disappearance. All values have been corrected for endogenous respiration.

The techniques described by these investigators were used for growing cells of *A. vinelandii O* and for the preparation of the crude cell free extract. Protein was estimated by the biuret reaction of Gornall *et al.*[4] and inorganic phosphate in the TCA soluble fraction of the reaction mixture by the method of Fiske and Subbarow[5]. The N_2^{15} concentration was determined by measuring the ratio of mass 28/29 in a Consolidated Nier mass spectrometer. Oxygen uptake was determined by the conventional Warburg method. The reaction time varied from 10 to 20 minutes and was stopped by addition of 0·5 ml of 20% TCA.

[1] E. C. Slater, Repts. 3rd Intern. Congr. Biochem. Brussels, 264 (1955). – A. Tissieres and E. Slater, Nature *176*, 736 (1955). – I. A. Rose and S. Ochoa, J. biol. Chem. *220*, 307 (1956).

[2] L. A. Hyndman, R. H. Burris, and P. W. Wilson, J. Bact. *65*, 522 (1953).

[3] P. E. Hartman, A. F. Brodie, and C. T. Gray, J. Bact. *74*, 319 (1957).

[4] A. C. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David, J. biol. Chem. *177*, 751 (1949).

[5] C. H. Fiske and Y. Subbarow, J. biol. Chem. *66*, 375 (1925).

Table II

Exposure time	Conditions	P/O ratio	Atom percent N_2^{15} excess
15 min	Substrate: 20μmoles α-ketoglutarate. Dialyzed extract. Acceptor system: 5 μmoles glucose + 3 mg hexokinase + 2·5 μmoles ADP	0·45—0·50	0·020—0·028
20 min	Similar conditions. Mannose substituted for glucose in the acceptor system	0·38—0·48	0·021—0·031
20 min	Similar conditions. Undialyzed extract substituted for dialyzed extract	0·47—0·55	0·030—0·031

Each flask contained 1·0 ml extract (15 mg protein), 20 μmoles substrate, 12 μmoles phosphate, 30 μmoles NaF, 15 μmoles $MgCl_2$. Gas phase: 10% N_2^{15} (32 atom excess), 20% O_2, 70% He. Other conditions were described in Table I.

The data in Table I show the effect of substrate on oxidative phosphorylation. The P/O ratios obtained with succinate and fumarate as substrates agree with those obtained by Hartman, Brodie, and Gray[3]. Although the P/O ratios with α-ketoglutarate were consistently higher than with these two substrates, they never reached the values reported by these authors. Experiments with dialyzed and undialyzed extracts gave approximately the same P/O values. However, undialyzed extracts did show a small phosphate uptake in the absence of added acceptor. The replacement of mannose by glucose in the acceptor system did not alter the P/O ratio.

The atom percent N_2^{15} excess data presented in Table II, indicate a small but significant incorporation of N_2^{15}. Substitution of other substrates for α-ketoglutarate had no effect in the amount of N_2^{15} incorporated. Although all extracts studied consistently showed a P/O ratio in the ranges indicated for the various systems, not all extracts incorporated N_2^{15}.

We conclude that previous attempts to obtain consistent fixation of N_2^{15} by cell free extracts of the azotobacter (see, for example, Magee and Burris[6]) did not arise from lack of oxidative phosphorylation.

Supported in part by grant E-1417 from the National Institutes of Health, Public Health Service.

A. Temperli and P. W. Wilson

Department of Bacteriology, University of Wisconsin Madison, Wisc., (U.S.A.), May 15, 1958.

Zusammenfassung

Zellfreie Extrakte von *Azotobacter vinelandii O* wurden auf ihr Vermögen zur oxydativen Phosphorylierung und Stickstoffixierung untersucht. Obwohl alle Präparate die Fähigkeit zur oxydativen Phosphorylierung besassen und einige davon in der Lage waren Stickstoff zu fixieren, konnte zwischen den beiden Vorgängen – unter den geschilderten experimentellen Bedingungen – keine Abhängigkeit gefunden werden.

[6] W. E. Magee and R. H. Burris, J. Bact. *71*, 635 (1956).

Eintritt und Mechanismus phagenhemmender Wirkungen

Verschiedene, von uns[1] aufgefundene, phagenhemmende Stoffe besitzen Wirkungen gegenüber T_1 Phagen und nicht gegenüber den anderen Coliphagen, andere zeigen eine Wirksamkeit gegen $T_{1, 3, 5}$ und $_7$, nicht auf die $T_{2, 4, 6}$ Phagen. Es schien zur Aufklärung dieser Wirkungsspezifität erwünscht, die Wirkungsbedingungen solcher Substanztypen genauer abzuklären. Es wurde zunächst die zeitliche Relation des Wirkungseintrittes zu Phagen- und Bakterienentwicklung untersucht.

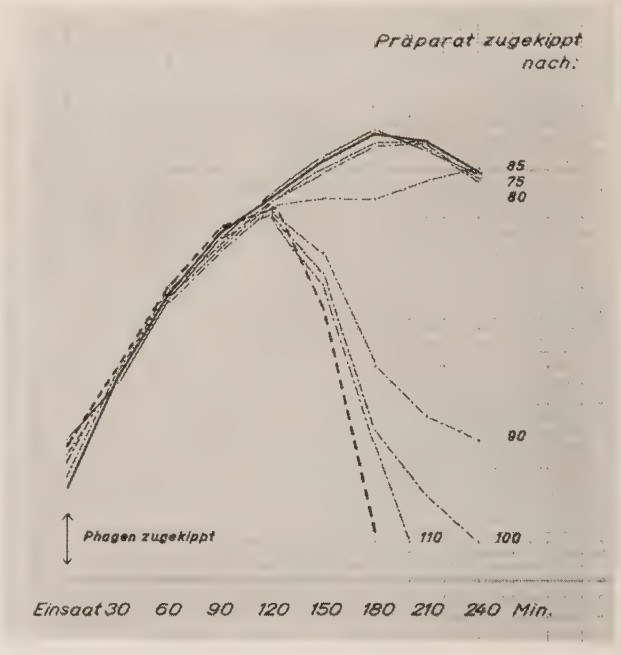


Abb. 1. 15858/E + *Coli* 207 1:60 + Phagen 10^8 in Difco Bouillon 6% (Präparat Konzentration 1:5000).

Bakterien-Kontrolle ————————
Phagen-Kontrolle — — —
Präparaten-Kontrolle . . . . . .
Bakterien + Phagen + Präparat ·—·—·—·—·

Mit Hilfe der von uns angewandten Methode der Atmungsmessung nach Warburg ist diese Untersuchung leicht und sicher durchzuführen.

Methodik. Im Hauptraum des Warburggefässes befindet sich die Bakterienkultur in Difco Bouillon 6%; im 1. Anhang die Phagensuspension. Ein zweiter Anhang dient zur Aufnahme der Wirksubstanz. Das Mittelstück des Warburggefässes wird zur Neutralisation des entstehenden CO_2 mit KOH-Lösung beschickt. Warburggefäss und Manometer werden mit O_2 durchlüftet und bei 37° C im Warburgapparat eingehängt. Nach erfolgtem Temperaturausgleich und Erreichen des gewünschten Bakterienwachstums (Einsaat), werden die Phagen und danach, in bestimmten Intervallen, die Wirksubstanz zugekippt. Als Testorganismen wählten wir:

[1] L. Neipp, W. Kunz und R. Meier, Exper. *13*, 74 (1957).

1. *Esch. coli* 207 mit entsprechenden Phagen;
2. *Esch. coli* Delbrück mit der T-Reihe.

Ergebnisse. Es wurde mit dieser Methode eine grosse Zahl von Stoffen untersucht. Über das typische Ergebnis mit einem Präparat Nr. 15858 E wird berichtet. Es zeigt im Reagenzglas folgendes Wirkungsspektrum gegenüber den verschiedenen Phagen (siehe Tab. I).

Wie bereits beschrieben[1] ist die Differenz der Empfindlichkeit zwischen diesen verschiedenen Phagen deutlich. Am empfindlichsten ist T_1 und am resistentesten sind

Tabelle I

Esch. coli 207			*Esch. coli* Delbrück						
Bakterien	Phagen	Bakterien	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7
3,3	5,1	3,9	5,8	0	5,1	0	5,1	0	4,8

Werte: Wirksame Konzentration in –log ausgedrückt.

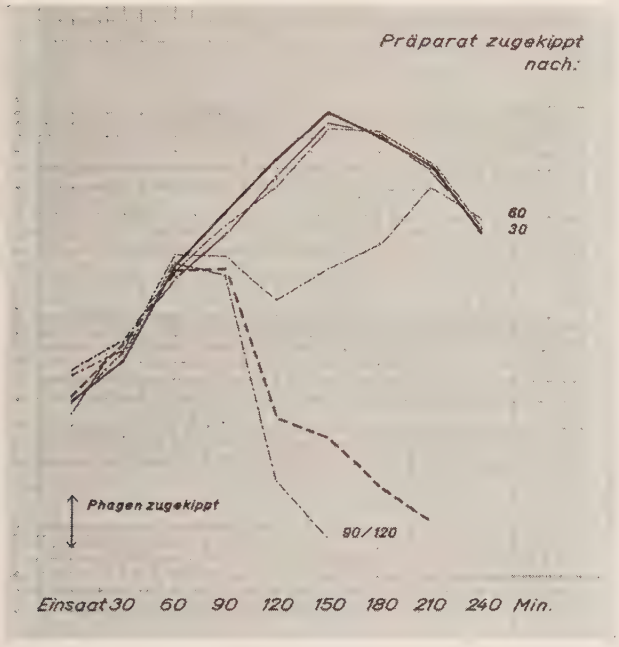


Abb. 2. 15858/E + *Coli* Delbrück 1:40 + T^1 Phagen 10^6 in Difco Bouillon 6% (Präparat Konzentration 1:30000).
Bakterien-Kontrolle ————
Phagen-Kontrolle – – – –
Präparaten-Kontrolle ·—·—·—·—·
Bakterien + Phagen + Präparat ·–·–·–·–·

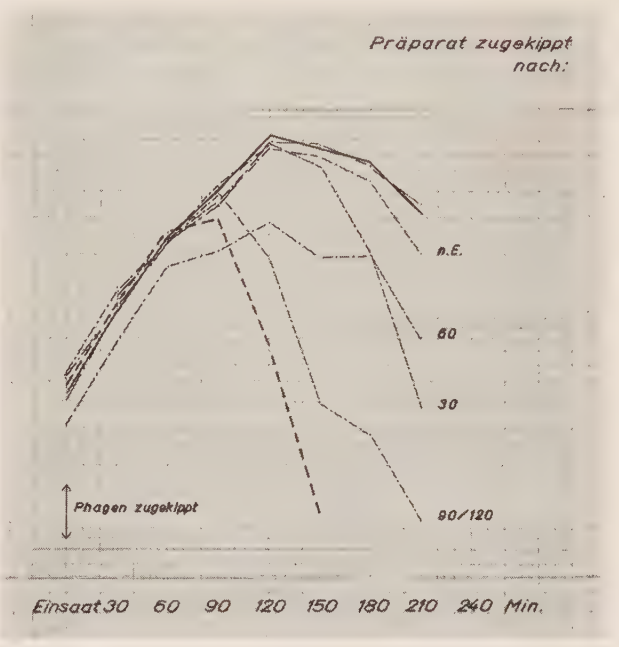


Abb. 3. 15858/E + *Coli* Delbrück 1:40 + T^5 Phagen 10^8 in Difco Bouillon 6% (Präparat Konzentration 1:30000).
Bakterien-Kontrolle ————
Phagen-Kontrolle – – – –
Präparaten-Kontrolle ·—·—·—·—·
Bakterien + Phagen + Präparat ·–·–·–·–·

Tabelle II

Phagenentwicklung ohne bzw. unter Einwirkung von Präparat 15858 E (Werte: Anzahl Phagen pro cm^3/Kultur).

Versuchsdauer	Phagenentwicklung ohne Präparat-Einwirkung		Präparat 15858 nach Erreichung der «Einsaat» zugekippt		Präparat 15858 E 1 h nach der Einsaat zugekippt	
	Gesamte Phagen	Freie Phagen	Gesamte Phagen	Freie Phagen	Gesamte Phagen	Freie Phagen
Einsaat	$2{,}8 \times 10^3$	$4{,}0 \times 10^2$	$5{,}7 \times 10^3$	$3{,}4 \times 10^3$	$5{,}7 \times 10^2$	$2{,}0 \times 10^2$
½ Stunden	$1{,}6 \times 10^6$	$1{,}4 \times 10^5$	$0{,}5 \times 10^3$	$0{,}1 \times 10^3$	—	—
1 Stunde	$3{,}9 \times 10^8$	$1{,}1 \times 10^8$	$3{,}5 \times 10^3$	$0{,}5 \times 10^3$	$9{,}8 \times 10^8$	$4{,}3 \times 10^6$
1½ Stunden	$1{,}1 \times 10^{11}$	$6{,}4 \times 10^{10}$	$0{,}5 \times 10^3$	$0{,}5 \times 10^3$	$1{,}2 \times 10^9$	$2{,}8 \times 10^7$
2 Stunden	$1{,}9 \times 10^{11}$	$6{,}1 \times 10^{10}$	$0{,}3 \times 10^3$	$0{,}4 \times 10^3$	$4{,}1 \times 10^8$	$7{,}3 \times 10^4$
2½ Stunden	—	—	—	—	$4{,}3 \times 10^8$	$7{,}4 \times 10^4$

$T_{2, 4, 6}$, 207, T_3 und T_5 sind gleich empfindlich, nur T_7 besitzt eine «intermediäre» Stellung zwischen der geraden und ungeraden Reihe.

Zunächst war notwendig festzustellen, ob der untersuchte Stoff eine direkte phagozide Wirkung besitzt. Zu diesem Zwecke wurden die Phagensuspensionen zu verschiedener Konzentration derselben, die oberhalb der bakteriziden Wirkung liegt, zugesetzt und bis zu 24 h inkubiert. Die Phagen blieben nach dieser Einwirkungszeit virulent. Eine einfache phagozide Wirkung als Ursache des Effektes kann somit ausgeschlossen werden.

Die Befunde über den Wirkungseintritt ergeben sich aus den anliegenden Kurven. Bei der Versuchsanordnung tritt Bakteriolyse ohne Hemmstoff nach $1^1/_2$ bis 2 h ein. Volle Schutzwirkung gegenüber der Phagenwirkung tritt nach Zusatz der Hemmstoffe noch dann ein, wenn der Zusatz 30 min vor der Lyse erfolgt. Es ist möglich, dass in gewissen Konzentrationen auch noch geringere Intervalle des Zusatzes vor der definitiven Lyse wirksam sind. Die Wirkung tritt somit bis zu einem ganz bestimmten Entwicklungspunkt der Phagen, beziehungsweise der Bakterien ein.

Die Bestimmungen der Phagenmenge (siehe Tab. II) im Verlauf der Hemmversuche ergab, dass die untersuchten Stoffe bei unbeeinträchtigtem Wachstum der Bakterien eine Vermehrung der Phagen verhindern. Die Hemmung der Phagenentwicklung ist sofort oder mindestens nach einer Einwirkungszeit von ungefähr 30 min manifest. Kurz nach der Zugabe der Wirksubstanz kann noch ein leichtes Ansteigen des Phagentiters festgestellt werden; danach bleibt die Gesamt-Phagenmenge stationär. Meist tritt ein Rückgang der freien Phagen auf.

Die phagenhemmende Wirkung beruht daher auf einer Entwicklungshemmung der Phagen.

Verhinderung der Lyse tritt solange ein, als die Zahl der Phagen die für komplette Lyse notwendige Menge nicht erreicht. Die relative Abnahme der freien Phagen gegenüber den gesamten kann dafür sprechen, dass die Phagen in einer unwirksamen Form am Bakterium adsorbiert werden und dadurch ihre Vermehrung ausbleibt, oder dass keine wirksamen freien Phagen gebildet und abgegeben werden. Da die Phagen selbst offenbar nicht beeinflusst werden, können die Stoffe spezifisch auf einen Mechanismus der Bakterien wirken, der für die Phagenentwicklung massgebend ist. Die früher geäusserte Auffassung über den Wirkungsmechanismus der untersuchten Stoffe wird durch diese Befunde bestätigt; über analoge Befunde mit weiteren Stoffen wird später berichtet werden.

Für überaus sorgfältige Durchführung der Versuche sind wir Frl. M. Tritschler zu grossem Dank verpflichtet.

R. Meier, L. Neipp und W. Kunz

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, 28. Juli 1958.

Summary

The described antiphage substance: bis-[[4-[4-(3-diethylamino-propylamino)-6-methyl-2-pyrimidyl-amino]-phenyl]]-sulphone tetrahydrochloride tetrahydrate produces its effect not through a direct phagocytic action but indirectly through an inhibition of the phage production. The effect is complete during the whole logarithmic growth phase as long as the phage concentration is kept under the limit, critical for bacteriolysis.

Ähnlichkeit und Unterschied Leukozytenemigrationsfördernder Wirkung gram-positiver und gram-negativer Bakterien

Polysaccharide aus gram-negativen Bakterien und ihren Kulturfiltraten besitzen auf Leukozyten zwei Wirkungen:

1. Bei gleichmässiger Verteilung im Milieu, zirkuläre Auswanderungsförderung.

2. Bei exzentrischer Anbringung des Polysaccharids eine gerichtete Auswanderung der Leukozyten.

Auf Grund unserer Befunde ist anzunehmen, dass beide Reaktionen auf dem gleichen Wirkungsmechanismus beruhen[1]. Aus gram-positiven Bakterien isolierte Polysaccharide wurden bisher unwirksam gefunden[2], nur bestimmte Filtrate von «Plasma»-Kulturen zeigen chemotaktische Wirkung[3].

Gram-negative und gram-positive *lebende* Bakterien, exzentrisch zu Leukozyten angebracht, bewirken, wie die Polysaccharide gram-negativer Bakterien, eine gerichtete Auswanderung[4]. Es wurde bisher nicht untersucht, ob mit lebenden Bakterien eine zirkuläre Auswanderungsförderung der Leukozyten erreicht werden kann.

Die Feststellung scheint aber von besonderer Wichtigkeit, ob die Wirkung gram-negativer lebender Bakterien mit derjenigen ihrer Polysaccharide völlig identisch ist, und ob diese mit derjenigen lebender gram-positiver Keime in jeder Beziehung übereinstimmt. Um diesen Nachweis zu erhalten, sind die verschiedenen genannten Versuchsvarianten für gram-positive und gram-negative, lebende Keime durchzuführen. Zur Untersuchung von Wirkungen lebender Bakterien auf Zellen ist die Einhaltung genau ausgearbeiteter Versuchsbedingungen notwendig, um spezifische Wirkungen von «Nährbodenkonkurrenzphaenomenen» von anderen Effekten, wie pH-Änderung, Fibrinolyse, Toxinproduktion usw. zu trennen. Es muss ferner ausgeschlossen werden, dass wirksames Nährbodenmaterial mit den Bakterien eingeschleppt wird[5].

Folgende *Versuchsanordnung* hat sich als geeignet erwiesen: 24 h alte Ei-Bouillon (gram-positive Keime) oder Glucose-Bouillon (*Proteus vulg.* OX_{19}) Kulturen werden zentrifugiert, die Nährmedien abgehebert und die Bakterien in der gleichen Menge Tyrodelösung aufgenommen. Diese Bakterienaufschwemmung wurde als Ausgangslösung für die Überschichtungsversuche benutzt. Bei Züchtung der Keime auf synthetischen Nährböden wurde die 24 h alte Kultur direkt als Ausgangslösung verwendet. Von diesen Ausgangslösungen wurden Tyrodeverdünnungen hergestellt. Verwendete Keime: *Proteus vulg.* OX_{19}, *Enterococc. faecalis 51, Staph. haemolyt. b3, Streptococc. pyogenes 36.*

Die Versuchsergebnisse sind für *Proteus vulg.* OX_{19} und *Streptococc. pyogenes 36* in der Tabelle zusammengestellt. Die beiden andern angegebenen gram-positiven Keime verhalten sich ähnlich wie *Streptococc. pyogenes.*

Das Resultat der Versuche ist eindeutig. Es ergibt sich mit lebenden gram-negativen Bakterien in dieser Anord-

[1] R. Meier und B. Schär, Naunyn-Schmiedeberg Arch. *234*, 102 (1958).

[2] R. Meier und B. Schär, Hoppe-Seyl. Z. *307*, 103 (1957).

[3] R. Meier, Helv. chim. Acta *24*, 134/E (1941).

[4] R. Meier und B. Schär, Exper. *9* (3), 93 (1953). – B. Schär, F. W. Kahnt und G. Huber, Helv. physiol. Acta *15* (1), 116 (1957). – R. Meier, P. A. Desaulles und B. Schär, Arch. exp. Path. Pharmak. *224* (2), 104 (1955).

[5] R. Meier und B. Schär, Exper. *13*, 492 (1957).

Tabelle I

Verdünnung des Nährbodens	Exzentrische Auswanderungsförderung «*Chemotaxis*»	Zirkuläre Auswanderungsförderung					
		1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000
Proteus vulg., lebend	+	+	+	+	+	+ –	∅
Proteus vulg., tot	+			+	+	+	∅
Strept. pyog., lebend	+	–	+ –	+	∅	∅	
Strept. pyog., tot	–	∅	∅	∅	∅		
PS-Konzentrationen		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Polysacch. aus *Proteus vulg.* . . .	+	+ –	+	+	+	+	+
Polysacch. aus *Strept. pyog.* . . .	–	∅	∅	∅			

nung eine zirkuläre Auswanderungsbeschleunigung. Sie ist von der Zahl der zugesetzten Bakterien eindeutig abhängig, sie gleicht in allen Einzelheiten der in gleicher Anordnung mit Polysaccharid gram-negativer Bakterien hervorgerufenen. Ein Unterschied mag darin bestehen, dass bei hohen Keimzahlen schneller eine Hemmung der Leukozyten auftritt als bei analoger Steigerung der Polysaccharide, erklärbar durch zusätzliche Produktion toxischer Stoffe.

Gram-positive Bakterien, über die Leukozytenkulturen gleichmässig verteilt, ergeben ebenfalls eine von der Zahl der Bakterien abhängig zirkuläre Auswanderungsförderung der Leukozyten. Sie unterscheidet sich von der durch lebende gram-negative hervorgebrachten dadurch, dass die «Konzentrations-Wirkungskurve» eine andere ist. Die Auswanderungshemmung bei hohen Keimzahlen geht bei zunehmender Verdünnung in eine mässige Auswanderungsförderung über, die mit weiterer Verdünnung rasch wieder auf die Auswanderungswerte der Kontrollen zurückgeht.

Ausser den quantitativen Differenzen der Wirkung von gram-negativen und gram-positiven Keimen sind solche qualitativer Art vorhanden. Bei der exzentrischen Auswanderungsförderung, der «Chemotaxis», kommt es bei gram-positiven Bakterien leichter zu einer mehr gehäuften Ansammlung der Leukozyten, ohne die bei gram-negativen Keimen meist erhebliche Verlängerung der Auswanderungszone. Die Auswanderung unter Einfluss der gram-positiven Keime ist meist dichter als bei gram-negativen. Die Granulocyten an der Peripherie des Auswanderungsareals können eine zirkuläre wallartige Ansammlung bilden.

Die vorliegenden Versuche ergaben somit, dass lebende gram-positive und gram-negative Bakterien in ähnlicher Weise eine Steigerung der zirkulären und exzentrischen Leukozytenemigration hervorrufen. Bei gram-negativen ist diese Wirkung auf die in ihnen enthaltenen oder durch sie produzierten Polysaccharide zu beziehen, während bei gram-positiven Bakterien mit Sicherheit ein anderer Mechanismus und wahrscheinlich auch andere Stoffe für den Effekt verantwortlich sind. Es ist bemerkenswert, dass ein gleicher biologischer Effekt offenbar durch differente biochemische Mechanismen ausgelöst wird.

R. Meier und B. Schär

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, 14. Juli 1958.

Summary

Live gram-positive and gram-negative bacteria cause circular and 'chemotactic' eccentric promotion of leucocyte emigration in a similar manner. In the case of gram-negative bacteria this effect corresponds to that of their polysaccharides, whereas in the case of gram-positive bacteria the polysaccharides are inactive.

Thus, although gram-positive and gram-negative bacteria both have a similar effect on leucocyte emigration, the underlying mechanism of action is different.

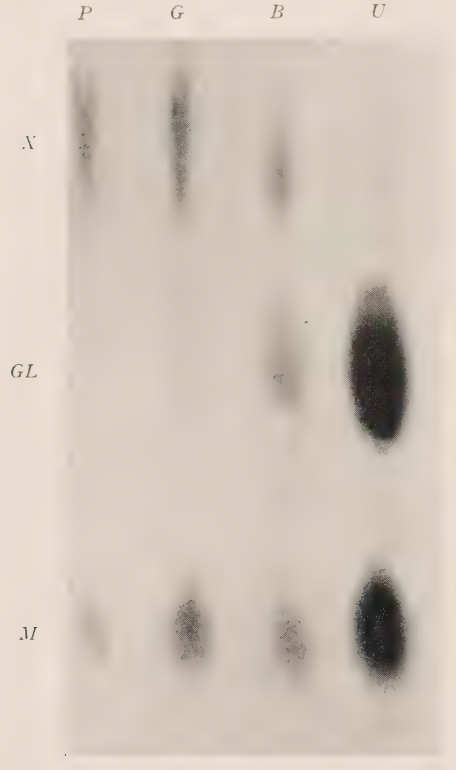
Some Observations on the Metabolism of S^{35}-Methionine During Development of the Sea Urchin Eggs

In the unfertilized egg of the sea urchin *Paracentrotus lividus* the activity of sulfur-labeled methionine has been found to accumulate mainly in the so-called nonprotein fraction (fraction soluble in 10% trichloroacetic acid, TCA). Upon fertilization (Nakano and Monroy[1]) or parthenogenetic activation (Nakano, Giudice, and Monroy)[2] the activity appears to be rapidly transferred to other cell components, among these the mitochondria. At the blastula stage an equilibrium appears to have been reached and, in fact, the activity of the TCA-soluble fraction remains almost constant until the pluteus stage. Then it appeared interesting to find out[1] in which form the labeled methionine is taken up and stored by the unfertilized egg; and[2] how it is metabolized in the course of development. Some preliminary results of this investigation will be reported here. The S^{35}-DL-methionine was administered to the eggs as previously described (Nakano and Monroy[3]). The eggs or embryos were homogenized (after removal of the jelly coat in the case of unfertilized eggs) in 10% TCA in the cold and the homogenate centrifuged at 1250 g for 10 min. The sediment was rehomogenized and, after standing overnight in the refrigerator, centrifuged as before. The extracts were pooled and shaken with several changes of ether to remove TCA. After being desalted and concentrated to a small volume, one part of the extract was hydrolyzed (with 6 N hydrochloric acid for 12 hours at 110° C). Both the hydrolyzed and nonhydrolyzed extracts were chromatographed one-dimensionally in duplicate with tertiary-butanol-formic acid-water (70:15:15) as the solvent.

For the location of the S^{35}-containing compounds the chromatogram was left in contact with an X-ray film for about 30 days. One chromatogram of each series was spread with nynhydrin, the other with potassium iodo-

[1] E. Nakano and A. Monroy, Exp. Cell Res. *14*, 236 (1958).
[2] E. Nakano, G. Giudice, and A. Monroy, Exper. *14*, 11 (1958).
[3] E. Nakano and A. Monroy, Exper. *13*, 416 (1957); Exp. Cell Res. *14*, 236 (1958).

platinate (Winegard *et al.*[4]) for the detection of sulfur-containing amino acids.



Radioautogram of a chromatography of the unhydrolyzed TCA-extract of unfertilized eggs (*U*), Blastulae (*B*), Gastrulae (*G*) and Plutei (*P*) of *Paracentrotus lividus* showing changes in distribution of radioactivity in the course of development. S^{35}-methionine was administered to unfertilized eggs as described in the text. *M* methionine; *Gl* glutathione; *x* spot '*x*'.

The TCA-insoluble fraction of the homogenate was extracted with alcohol-ether 3:1, once at room temperature and once in a water bath at 70° C; twice with ether-alcohol 3:1; twice with ether and finally dried. The dry powder was hydrolyzed and chromatographed as above.

The chromatogram of the TCA-soluble fraction and some control experiments soon showed that, as a result of the treatment with TCA, methionine is partially converted into methionine-sulphone. Therefore in some of the experiments the eggs were homogenized in 60% methanol (final concentration).

In the autoradiograms of non-hydrolyzed TCA or methanol extracts of unfertilized eggs two main radioactive spots are present which can be identified as methionine and glutathione. Methionine sulphone appears as a darker spot superimposed on the lower part of that of glutathione in the autoradiograms of TCA extracts.

Occasionally, one or two small radioactive spots are present close to the upper end of the glutathione.

In the autoradiograms of the hydrolyzed extracts those small spots as well as the glutathione disappear. A spot which may be identified as cystine and another one (probably cysteic acid) now become visible.

The autoradiograms of non-hydrolyzed TCA extracts of various stages of development (Figure) (blastula gastrula and pluteus) show that the spot of free methionine is present throughout development until the pluteus stage. The spot of glutathione is still evident, although considerably weaker, in extracts of blastulae; whereas in extracts of gastrulae it is barely visible and in the plutei it has disappeared entirely. In the upper part of the autoradiograms of these developmental stages a new radioactive spot (spot x) is present. Due to tailing it has a rather indefinite outline. Since upon hydrolysis it disappears it seems likely to be a peptide. The staining of the chromatograms with iodoplatinate shows a positive reaction corresponding to the position of 'spot x' not only in the developmental stages, but also in the extracts of unfertilized eggs in which no radioactivity is found in that part of the autoradiogram.

Control experiments in which unfertilized eggs were allowed to age for about 6 hours did not show any appreciable change in the above distribution of radioactivity in the TCA-soluble fraction.

It seems interesting to draw attention to the rapid uptake of the labelled sulfur atom of methionine into glutathione (probably through conversion into cysteine) which the present experiments have demonstrated in the unfertilized egg. As previously shown (Nakano and Monroy[1]), by far the largest portion of radioactivity in the unfertilized egg is to be found in the TCA-soluble fraction and the present results now indicate that methionine and glutathione are the two major compounds in which the radioactive sulfur-atom is stored. However, in the course of development the radioactivity of glutathione disappears much more quickly than that of methionine, which in fact, is present even in the pluteus stage. No appreciable quantitative changes in glutathione have been found in the course of sea urchin development (Kavanau[5]).

This suggests that glutathione may be considered as an intermediate through which sulfur is funnelled to the proteins of the embryo. The idea of glutathione being an intermediate in protein synthesis has been presented several times (see for example Roberts and Bolton[6], Hanes, Hird and Isherwood[7]). Nothing can be said at present concerning the significance of the radioactive 'spot x'.

It would be interesting if the radioactive 'spot x' present in the developmental stages and the non radioactive one present in the unfertilized eggs were the same compound. This would in fact be evidence for a peptide which is inert before fertilization and begins to exchange in the course of early development.

No clear cut results have been obtained with the protein (TCA-insoluble) fraction, the activity of the radioactive spots being too low.

This investigation has been supported by Grants from the Rockefeller Foundation and Consiglio Nazionale delle Ricerche.

E. Nakano* and A. Monroy

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), July 1st, 1958.

Riassunto

Si è studiato il metabolismo della metionina-S^{35} nella frazione non-proteica (TCA-solubile) nel corso dello sviluppo di *Paracentrotus lividus*.

Nell'uovo vergine la radioattività si ritrova in buona parte nel glutatione libero. Nel corso dello sviluppo l'attività nel glutatione diminuisce progressivamente mentre, contemporaneamente, si ha la marcatura di un peptide.

[4] H. M. Winegard, G. Toennies, and R. J. Block, Science *108*, 506 (1948).

[5] J. L. Kavanau, J. exp. Zool. *122*, 285 (1953).

[6] R. B. Roberts and E. T. Bolton, Science *115*, 479 (1952).

[7] C. S. Hanes, F. J. R. Hird, and F. A. Isherwood, Nature *166*, 288 (1950); Biochem. J. *51*, 25 (1952).

* Present address: Biological Institute, Nagoya University, Nagoya, Japan. – Aided by a Grant from the Rockefeller Foundation.

Further Studies on Free Amino-Acids and Peptides in Eggs and Embryos of Different Sea-Urchin Species and Hybrids

In a previous study (CHEN and BALTZER[1]) it has been reported that eggs and embryos of three different sea-urchin species, that is to say *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* and *Sphaerechinus granularis*, differ distinctly in their patterns of free amino-acids and peptides. Such species-specific differences provide us with valuable criteria to judge the influences of both parental species on the developing hybrid-embryos. Recently in order to explore further possibilities of interspecific combinations we have investigated the free ninhydrin-positive substances in both eggs and embryos of three more sea-urchin species: *Genocidaris maculata*, *Psammechinus microtuberculatus* and *Echinocardium cordatum*. The first two species belong to the so-called regular form of *Echinoidea* while the third one is the irregular form. Our preliminary results showed that in all three species the patterns of free amino-acids and peptides are constant during early development and differ again from each other in a species-specific manner.

Procedures for performing two-dimensional chromatograms were the same as those described earlier (CHEN and BALTZER[1]). In addition the one-dimensional chromatographic technique has been used to study the total amount of free ninhydrin-reacting components (for a general description of the technique, see HADORN and STUMM-ZOLLINGER[2], CHEN and HADORN[3]). As a basis for comparison estimations of total nitrogen have been also carried out by using the ultramicro-Kjeldahl method of BOELL and SHEN[4]. It was found that for total free amino acids 1000–2000 eggs and for total nitrogen 250–500 eggs were enough for each determination.

As illustrated by the chromatograms in Fig. 1 and the list of ninhydrin-reacting substances summarized in Table I, there are both qualitative and quantitative differences in the three sea-urchin species. *E. cordatum* is especially rich in free amino-acids. For instance in all species so far analyzed by us, valine and leucine never occur in such large quantities as in the present one (compare spots No. 9 and No. 16 in Fig. 1 *A* and the corresponding spots of other species in the present study and in CHEN and BALTZER[1]). The *Echinocardium* eggs are further characterized by the occurrence of spot No. 17 which has been so far recorded only in *A. lixula*. However, they differ from the latter by their high contents of glycine (compare spot No. 8, Fig. 1 *B* in CHEN and BALTZER[1]). The pattern of free ninhydrin-positive substances showed no distinct changes at both gastrula and pluteus stages.

The chromatographic patterns of *G. maculata* and *Ps. micromaculatus* are very similar to *P. lividus* in so far that α-Alanine and Glycine represent the most concentrated spots in both species (Fig. 1 *B* and *C*). However, a closer examination of the chromatograms revealed certain differences. Spot No. 23 (peptide 4 in Tab. I) was found only in *Ps. microtuberculatus*. Its Rf-values (0,65 in water-saturated phenol and 0,47 in 70% n-propanol) are very close to those of the tripeptide spot specific for *S. granularis* reported in our earlier study (CHEN and BALTZER[1], spot No. 23 in Fig. 1 *C*), although the spot did not appear so regularly as in the latter species. In *G. maculata* a brown spot of low Rf-values (0,17 in 70% n-propanol and 0,21 in water-saturated phenol) was recorded (spot No. 21 in Fig. 1 *C*). Judging from its ninhydrin color and its position on the chromatograms this substance is probably identical to the peptide reported previously for *P. lividus* (see CHEN and BALTZER[1], spot No. 21 in Fig. 1 *A*).

Fig. 1.—Free ninhydrin-positive substances in methanol extracts of different sea-urchin eggs. *A Echinocardium cordatum* (11250 unfertilized eggs); *B Psammechinus microtuberculatus* (12208 unfertilized eggs); *C Genocidaris maculata* (ca. 7500 unfertilized eggs). *1* α-Alanine; *2'* β-Alanine; *3* Arginine; *4* Aspartic acid; *5* Cystine; *6* Glutamic acid; *7* Glutamine; *8* Glycine; *8'* Histidine; *9* Leucine (and/or isoleucine); *10* Lysine; *12* Proline; *13* Serine; *14* Threonine; *15* Valine (and/or methionine); *17* 'Fast-aminobutyric acid'; *19–23* Peptides.

The protein residues after the methanol extraction were subjected to acid hydrolysis. In all three species the chromatograms of the hydrolysates showed the following amino-acids: α-alanine, arginine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, histidine, leucine (isoleucine) serine, thre-

[1] P. S. CHEN and F. BALTZER, Nature *181*, 98 (1958).
[2] E. HADORN and E. STUMM-ZOLLINGER, Rev. suisse Zool. *60*, 506 (1953).
[3] P. S. CHEN and E. HADORN, Rev. suisse Zool. *61*, 437 (1954).
[4] E. J. BOELL and S. C. SHEN, Exp. Cell Res. *7*, 147 (1954).

Table I. Free amino-acids and peptides in methanol extracts of different sea-urchin eggs and embryos. (Substances which occur in specifically high concentrations are indicated by a '!'.)

Free ninhydrin-reacting substances	A *Echinocardium cordatum*	B *Psammechinus microtuberculatus*	C *Genocidaris maculata*
1 α-Alanine	+	+	+
2′ β-Alanine	+	–	–
2 Arginine	+	+	+
4 Aspartic acid	+	+	+
5 Cystine	+	+	+
6 Glutamic acid	+	+	+
7 Glutamine	+	+	+
8 Glycine	+	+	+
8′ Histidine	+	–	–
9 Leucine (iso-Leucine)	+ !	+	+
10 Lysine	+	+	+
12 Proline	+	+	–
13 Serine	+	+	+
14 Threonine	+	–	–
16 Valine (Methionine)	+ !	+	+
17 'Fast-aminobutyric acid'	+ !	–	–
19 Peptide 1	+	+	+
20 Peptide 2	+	–	–
21 Peptide 3	–	–	+ !
23 Peptide 4	–	+ !	–

onine, tyrosine, proline, and valine (or methionine). This confirmed the earlier findings that, in spite of the species-specific differences in free ninhydrin-positive components, the amino-acid composition of the proteins remains at least qualitatively the same.

Since the chromatographic patterns of *E. cordatum* and *P. lividus* differ in spot No. 17 and the spots of valine and leucine, we made a brief study of the free ninhydrin-positive substances in the hybrid *Echinocardium* ♀ × *Paracentrotus* ♂ (EP). Our preliminary result of a few chromatograms showed that spot No. 17, which is specific for *Echinocardium*, appeared distinctly on the hybrid chromatogram. However, the concentrated spots of valine and leucine were not observed. At the present time it remains uncertain whether the EP-hybrid behaves entirely in a maternal manner as the hybrid combinations *Paracentrotus* ♀ × *Arbacia* ♂ and *Sphaerechinus* ♀ × *Paracentrotus* ♂ (see Baltzer, Chen, and Whiteley[5]).

In order to get more informations on the amino-acid metabolism during sea-urchin development we determined the total nitrogen and the total free amino-acids and peptides of four species thus far analyzed by us (see the more detailed report of Baltzer, Chen and Whiteley[5]). As shown by the data given for unfertilized eggs in Table II, there is a large variation in the egg sizes of the different sea-urchin species. *A. lixula* has the smallest and *E. cordatum* the largest eggs, while the egg sizes of *P. lividus* and *S. granularis* are equal. The same holds true for total nitrogen (compare Harvey[6], for related data on *A. punctulata* and *P. lividus*). The egg volume of *A. lixula* is only 59% of that of *P. lividus*. With regard to total ninhydrin-positive components the values are high for *E. cordatum* and extremely low for *A. lixula*. The total content per egg for *Arbacia* is 20% of that for *Paracentrotus*. The difference remains pronounced even when the figures are compared on the basis of total nitrogen (Table II, E.U./γN). The *Echinocardium* egg has about 7 times more free amino-acids than the *Arbacia* egg (Table II, E.U./10^3 eggs). The values are still three times higher for the former species even when the data are expressed as extinction unit per μg total nitrogen. The morphogenetic role of the free amino-acids is largely unknown. Beside their function as building stones for the proteins they may serve as energy sources for the maintenance of the developing embryo. It has also been reported that glycine, which represents the most concentrated amino-acid in most sea-urchin species, is especially involved in the osmoregulative phenomenon (Kavanau[7]). For a better understanding of the biochemical basis of morphogenetic development, such species-specific differences in the amino-acid contents deserve our special attention.

Another question which appears to be pertinent to the present study is whether these species-specific substances are derived from the yolk proteins deposited in the cell, or if they are directly related to the cytoplasmic part of the developing egg. During development there are no doubt such processes as the breakdown of egg proteins and the conversion of them into specific proteins of different tissues and organs. Efforts have been made by culturing the plutei for a longer period until their yolk reserve was exhausted and the feeding began. Our analysis of the larvae fed for 3–10 days showed that there is a pronounced accumulation of free glycine in *A. lixula*. Otherwise there is no essential modification of the amino-acid patterns. For instance spot No. 17, which is specific for *Arbacia* eggs, appeared regularly on the chromatogram even at these later stages. (No feeding experiment on *Echinocardium* was carried out.) In the other species glycine remains to be the dominating amino-acid. This indicates that the free ninhydrin-reacting compounds reported here

[5] F. Baltzer, P. S. Chen, and A. H. Whiteley, Symp. Soc. Cell Biol. (in press).

[6] E. B. Harvey, *The American Arbacia and Other Sea Urchins* (Princeton University Press 1956), 193.

[7] J. L. Kavanau, J. exp. Zool. *122*, 285 (1953).

Table II.—Size, total nitrogen, and total free ninhydrin-positive substances of different sea-urchin eggs

Species	Diameter mm/egg[1]	Volume relation (D^3) mm^3/egg	Total N γ/10^3 eggs	Total free ninhydrin-reacting substances	
				E. U./10^3 egg	E. U./γ N
Arbacia lixula	0·080	512×10^{-6}	8·50	0·080	0·0094
Paracentrotus lividus	0·095	857×10^{-6}	13·32	0·390	0·0293
Sphaerechinus granularis	0·095	857×10^{-6}	14·51	0·410	0·0282
Echinocardium cordatum	0·122	1816×10^{-6}	17·24	0·549	0·0318

[1] Measurements carried out by Prof. Dr. F. Baltzer. Compare data given by Harvey 1956, pp. 63–67.

for the different sea-urchin species should not be considered merely as intermediate decomposition products of the yolk proteins, but as active components in the cytoplasm of the developing egg.

This study was carried out at the Zoological Station of Naples, Italy in cooperation with Prof. Dr. F. Baltzer, to whom I should like to express my sincere thanks for taking care of the materials and counting the samples, and for his valuable discussions in the course of the experimental work. Thanks are also due to Prof. Dr. L. von Ubisch for supplying a part of the *Echinocardium* eggs investigated by us. The investigation was aided by a research grant from the *Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung*. Finally I should like to thank the authorities at the Zoological Station of Naples for providing the working facilities.

P. S. Chen

Institute of Zoology and Comparative Anatomy, University of Zurich, July 1, 1958.

Zusammenfassung

Als Fortsetzung früherer Untersuchungen der freien Aminosäuren und Peptiden in Eiern und Embryonen verschiedener Seeigelarten, wurde das Muster der Ninhydrin-positiven Stoffe von *Echinocardium cordatum*, *Psammechinus microtuberculatus* und *Genocidaris maculata* papierchromatographisch untersucht. Die *Echinocardium*-Eier zeichnen sich durch ihre hohe Konzentration an Valin (Fig. 1*A*, Fleck 16) und Leucin (Fleck 9) aus, welche bei allen übrigen von uns untersuchten Arten nur in sehr geringer Menge auftreten. Ferner sind sie durch das Vorkommen eines spezifischen Stoffes charakterisiert, der nur bei *Arbacia lixula* nachgewiesen wurde (Fleck 17). *Psammechinus microtuberculatus* und *Genocidaris maculata* unterscheiden sich in den Peptiden. Die *Psammechinus*-Eier enthalten einen Stoff, der wahrscheinlich mit dem Tripeptid von *Sphaerechinus granularis* identisch ist (Fig. 1*B*, Fleck Nr. 23). In *Genocidaris*-Eiern wurde ein Peptid registriert, das auch bei *Paracentrotus lividus* vorkommt (Fig. 1*C*, Fleck Nr. 21).

Es wurden ferner Messungen von Eivolumen, Totalstickstoff und Totalmenge der freien Ninhydrin-positiven Substanzen des unbefruchteten Eies durchgeführt. Das Eivolumen und der Gesamtstickstoffgehalt sind bei *Echinocardium cordatum* am grössten, bei *Arbacia lixula* am geringsten. Die *Echinocardium*-Eier sind durch ihren hohen Gehalt an freien Aminosäuren gekennzeichnet. Sie enthalten rund 7mal mehr solche Stoffe pro Ei als die *Arbacia*-Eier; zwischen *Paracentrotus lividus* und *Sphaerechinus granularis* zeigen die Messwerte keinen deutlichen Unterschied.

Fat Formation and Glycolysis in Tissue Culture Action of Hydrocortisone[1]

The question of the role of adreno-cortical steroids in fat metabolism remains as yet unsettled. On the one hand it appears that hydrocortisone is the only physiological compound that can cause obesity when administered in excess of body needs and that this type of obesity is indistinguishable from that of Cushing's syndrom. A synergistic effect of insulin and cortisone in increasing fat synthesis from carbohydrate was reported[2]. But on the other hand, antagonistic effects of cortisone and insulin on fatty acid synthesis from labeled acetate was described, cortisone having an inhibitory effect[2]. It has therefore been thought that information gained from a study of the direct action of hydrocortisone on fat formation in tissue culture may shed some light on this question. Since, however, the tendency to accumulate fat is a characteristic feature of tissue culture cells in general, even of such cell types which in the organism do not show a tendency to fat accumulation, a preliminary study of fat formation in normal untreated tissue culture cells appeared necessary.

Now, for many years, 2 distinctive characteristics of cultured cells have been observed. First, the presence of more or less high glycolysis[3], even in the presence of oxygen[4], and, second, a striking tendency to fat accumulation in cytoplasmic vacuoles[5]. It is tempting to assume that these 2 special characteristics of cultured cells are not independent of each other. From investigation into the action of high glucose concentration on respiration and glycolysis on the one hand, and on formation of fat vacuoles on the other hand, a possible relationship between glycolysis and lipogenesis has emerged, and the assumption has been made that glycolysis as a reducing system favors fatty acid synthesis. Lipogenesis requires a reducing system for the regeneration of reduced pyridine nucleotide necessary for fatty acid synthesis.

Methods.— For observation of lipid granules, the hanging drop method and a medium consisting of plasma and chick amniotic fluid[6] was used. Control cultures in amniotic fluid show far less fat accumulation than in other culture media[6]. In the first 2–4 days of growth, primary cultures of various tissues in a medium of plasma and amniotic fluid showed less fat accumulation, as estimated by number and size of fat vacuoles observed with 120 × magnification, than cultures in a medium containing embryo extract as well. If the media were not changed for several days, fat vacuoles gradually increased in number and size; by renewal of medium, or aeration, fat vacuoles could partly be removed. Mitoses were observed in cells containing large fat vacuoles. The lipid appeared predominantly to be produced by the cell and not to come from the medium, because it could be removed or reduced by renewal of the medium. Furthermore, cells in pure saline with glucose and with explants removed also showed fat vacuoles. Lipid containing cells often continued to produce acid mucopolysaccharide, as revealed by the method of mucin clot formation[7]. Addition of 0·5 to 2% glucose to the medium resulted in considerable increase of fat accumulation in the cytoplasm, compared with cultures growing in a medium of plasma and amniotic fluid only.

For investigation of the action of higher glucose concentrations on respiration and glycolysis, strain L derived from a fibroblast of mouse subcutaneous tissue was used

[1] Reported in part at 8th Annual Meeting of Tissue Culture Association at the University of Baltimore, Md., April 17, 1957.

[2] V. A. Najjar, *Symposium on Fat Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1954).

[3] F. Wind, Biochem. Z. *179*, 384 (1926). – O. Warburg and F. Kubowitz, Biochem. Z. *189*, 242 (1927). – F. Lipmann, Biochem. Z. *261*, 157 (1933). – H. Laser, Biochem. Z. *264*, 72 (1933). – M. Jones and S. L. Bonting, Exp. Cell Res. *10*, 631 (1956). – H. Harris, Brit. J. exp. Path. *37*, 512 (1956). – J. Paul and E. S. Pearson, Exp. Cell Res. *12*, 212, 223 (1957). – H. Grossfeld, Science *127*, 148 (1958).

[4] H. Laser, Biochem. Z. *264*, 72 (1933). – H. Harris, Brit. J. exp. Path. *37*, 512 (1956). – H. Grossfeld, Science *127*, 148 (1958).

[5] A. A. Krontowski, Arch. exp. Zellforsch. *11*, 94 (1931). – L. Doljanski, Arch. exp. Zellforsch. *11*, 261 (1931). – D. Ignatowitch, C. R. Soc. Biol. *76*, 607 (1914). – J. Zweibaum, Arch. exp. Zellforsch. *15*, 391 (1934). – R. A. Lambert and F. M. Hanes, Virchows Arch. *211*, 116 (1913). – J. J. Biesele and P. Goldhaber, Cancer Res. *15*, 767 (1955).

[6] H. Grossfeld, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *71*, 475 (1949).

[7] H. Grossfeld, Exp. Cell Res. *14*, 213 (1958).

and the following procedure was employed. Cells from 4 T–60 flasks, each containing about 15×10^6 cells, were scraped from the glass, pooled, centrifuged and the residue suspended in 12 ml fresh medium (with phenol red as pH indicator, pH 7·4), consisting of embryo extract, horse serum and Earle's balanced salt solution (containing 0·1% glucose and 0·22% $NaHCO_3$), in proportions of 20 : 40 : 40. 3 ml of the cell suspension were put into each of 4 Warburg flasks. To 2 of the Warburg flasks, 0·5 ml of Earle's solution containing glucose in final concentration of 1% was added, and to 2 control flasks 0·5 ml of Earle's solution without additional glucose. One control and one experimental flask contained 0·2 ml of 15% KOH in the central well for measurement of oxygen uptake; one control and one experimental flask contained 0·2 ml of H_2O in the central well. In this way, aerobic glycolysis could be determined by the difference between the readings on the flasks with and without alkali[8].

The results are shown in Figure 1. At higher glucose concentration, respiration is depressed and glycolysis increased. It appears that with excess of glucose, the cultured cell may switch to glycolysis, the less complex and less economic source of energy. The present results are in agreement with those obtained by Jones and Bonting[9] by lactate determination.

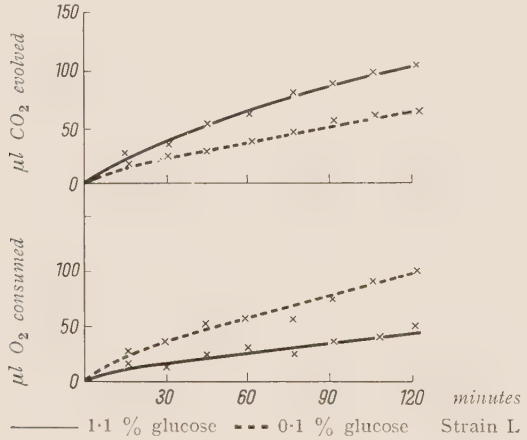


Fig. 1. ——— 1·1 % glucose - - - 0·1 % glucose Strain L

Increase of cytoplasmic lipid vacuoles in cells treated with hydrocortisone in high concentration was reported[10]. It was therefore of interest to test the effect of this glucocorticoid on respiration and glycolysis and the above described procedure of measuring respiration and aerobic glycolysis has been employed with strain L cells treated with hydrocortisone in concentration of 125 mg/ml. The results are shown in Figure 2 which demonstrates a stimulation of aerobic glycolysis and depression of respiration by concentrations known to increase fat vacuole formation. Glycolysis as a reducing system (and maybe also depression of respiration) appears to be involved in increased fat accumulation.

Discussion. Increased glycolysis in tissue culture had been found first by Wind[11] and by Warburg and Kubowitz[12] ($Q^{N_2}_{CO_2}$, was 40 to 50, against only 15 in the embryo from which the explanted tissue derived). This was confirmed by a great number of investigators[13], and many of them found also aerobic glycolysis in tissue culture, although the ratio of aerobic glycolysis to respiration seemed to vary under various conditions. Harris[14] recently reported that under both aerobic and anaerobic conditions most of the glucose consumed by the cells in tissue culture was converted to lactic acid. It is also evident that the unusually high consumption of glucose by cultured cells[15] is a result of prevailing glycolysis which is an uneconomical way of glucose utilization.

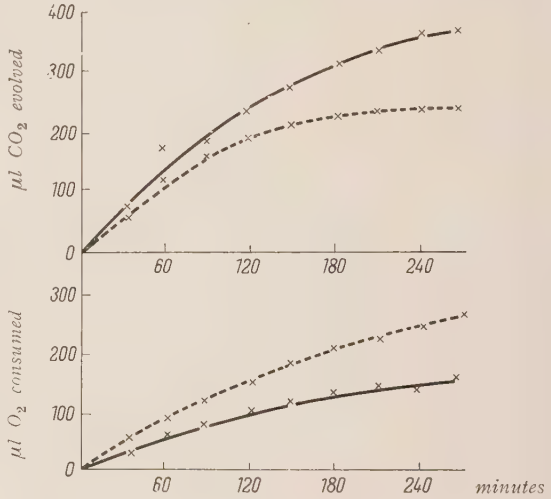


Fig. 2. ——— HC - - - control Strain L

The link between glucose concentration and glycolysis on the one hand and lipogenesis on the other hand appeared to be the fact that fatty acid synthesis requires a reducing system for regeneration of DPNH. Glycolysis providing a reductive environment with electron donors for regeneration of DPNH may be under certain conditions the driving force for reversing the oxidative pathway in the direction of lipogenesis[16]. Fatty acid synthesis is accomplished through repetition of a cycle of reactions, with condensation of two molecules of acetyl CoA, and reduction of acetoacetyl CoA to β-hydroxybutyryl CoA. In the presence of β-keto reductase, acetyl-S-CoA is reduced by DPNH. The reaction products are DPN, β-hydroxybutyryl-S-CoA and HS-CoA. This is followed by dehydration to crotonyl CoA, and its reduction to butyryl CoA. A new cycle is started by the reaction of butyryl CoA with another molecule of acetyl CoA, to form β-keto-caproyl CoA + CoA-SH, and so forth. The cycle is repeated eight times until stearyl CoA is formed[17]. Fatty acid synthesis requires thus the participation of reduced pyridine nucleotide. Since the oxidation of lactate is coupled with the reduction of DPN, the ability of lactate to regenerate reduced pyridyne nucleotide may be a key factor in stimulating lipogenesis[16]. Furthermore, the

[8] H. Grossfeld, Science *127*, 148 (1958).

[9] M. Jones and S. L. Bonting, Exp. Cell Res. *10*, 631 (1956).

[10] H. Grossfeld and Ch. Ragan, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *86*, 63 (1954). – A. S. Steen, Brit. J. Ophth. *35*, 741 (1951). – M. Holden and L. B. Adams, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *95*, 364 (1957). – G. Lenti, E. Tortarolo, G. Masolino, and D. Tappero, Folia endocrin. *4*, 743 (1957).

[11] F. Wind, Biochem. Z. *179*, 384 (1926).

[12] O. Warburg and F. Kubowitz, Biochem. Z. *189*, 242 (1927).

[13] F. Lipmann, Biochem. Z. *261*, 157 (1933). – H. Laser, Biochem. Z. *264*, 72 (1933). – M. Jones and S. L. Bonting, Exp. Cell Res. *10*, 631 (1956). – H. Harris, Brit. J. exp. Path. *37*, 512 (1956). – J. Paul and E. S. Pearson, Exp. Cell Res. *12*, 212, 223 (1957). – H. Grossfeld, Science *127*, 148 (1958).

[14] H. Harris, Brit. J. exp. Path. *37*, 512 (1956).

[15] S. Graff and K. S. McCarty, Exp. Cell Res. *13*, 348 (1957).

[16] H. Grossfeld, *Eighth Annual Meeting of the Tissue Culture Association Baltimore*, April 1957 (Abstr.). – Ch. Terner, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *96*, 801 (1957).

[17] F. Lynen, Harvey Lectures *48*, 212 (1954).

ability of glucose to regenerate reduced pyridine nucleotide during oxidation of phosphoglyceraldehyde to phosphoglyceric acid, where the hydrogen transfer likewise proceeds by way of diphosphopyridine nucleotide, may explain its effectiveness in stimulating fatty acid synthesis.

It may be worthwile mentioning that as end products of fermentation in worms, which consume six times as much glycogen in fermentation than in respiration, in addition to lactic acid, large amounts of higher fatty acids have been found[18]. It is also tempting to correlate the striking accumulation of lipid in the cytoplasm of healthy growing chondrocytes with the high glycolysis present in cartilage. In conclusion, a reducing system appears to be essential for efficient lipogenesis. Excess glucose increases both glycolysis and fat accumulation in cultured cells. Augmentation of lipid vacuoles observed in cultures treated with high concentrations of hydrocortisone appears to be connected with increase of glycolysis (and depression of respiration) by hydrocortisone in high concentration.

H. Grossfeld*

Departments of Medicine and Orthopedic Surgery, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, and Edward Daniels Faulkner Arthritis Clinic of the Presbyterian Hospital, New York City, April 25, 1958.

Zusammenfassung

Fettsäuresynthese wird durch die Anwesenheit eines glykolytischen reduzierenden Systems gefördert. Die auffallende Tendenz normaler Gewebskulturzellen zur Fettanhäufung im Zytoplasma scheint mit dem charakteristisch hohen Fermentationsstoffwechsel der Gewebskulturen zusammenzuhängen. Die Steigerung der Fettbildung durch Hydrocortison in hoher Konzentration mag auch in Zusammenhang stehen mit dessen Eigenschaft, Spaltungsstoffwechsel zu fördern.

[18] W. R. Slater, Biochem. J. *19*, 604 (1926). – T. v. Brand, Erg. Biol. *10*, 37 (1934).

* Supported by U. S. Public Health Service grant.

Effects of Cortisone and Ethylenediamine-Tetraacetic Acid on Deposition of Promethium (Pm^{147})

In this investigation cortisone, which has been reported to affect bone metabolism[1], was administered with the calcium salt of ethylenediamine-tetraacetic acid (CaEDTA) to enhance its effects on retention of promethium (Pm^{147}) in skeleton and other tissues of rats.

Twelve and one-half μc of $Pm^{147}Cl_3$ (half-life, 2·6 years) in 0·25 ml of dilute NaCl solution, pH 3, were injected intravenously into 20 young female Wistar rats (wt. range, 160–185 g). Of these rats three groups of five animals each were subsequently treated with CaEDTA and/or cortisone acetate according to the schema shown in Table I. Five rats received no treatment and served as controls.

The animals were maintained *ad libitum* on a standard stock diet throughout the 72-hour experimental period. Liver, spleen, kidney, and one femur from the killed animals were muffled and the residual ash dissolved in N/10 HCl. Samples of whole plasma, and of plasma proteins obtained by alcohol precipitation, were taken from the animals. An undecalcified femur from each animal was longitudinally transected and prepared for contact autoradiography. The sections were exposed for 72 hours at 4° C on No-screen x-ray film.

Concentrations of Pm^{147} in aliquots of the samples were measured in a gas counter. After correcting for self-absorption the radioactivity present in the samples was compared to aliquots of the original injection solution.

Tissue Distribution. The concentrations of Pm^{147} in the samples were found to be independent of the organs' weights. These data are expressed as per cent of administered dose per organ in Table II. This table also presents Pm^{147} concentrations in plasma and plasma proteins.

In each of the animal groups the liver contained the largest fractions of the injected Pm^{147}, in agreement with an early study[2]. As in a recent study[3] the amount of Pm^{147} in liver was decreased by 20% by CaEDTA treatment, a difference which was statistically valid at the 99% level of significance. No effects of CaEDTA treatment on retention of Pm^{147} in spleen, kidney or femur were detected.

In contrast to the marked localization of Pm^{147} in liver only small amounts were found in spleen. This suggests correspondingly that there was little uptake of radiocolloidal Pm^{147} by the reticuloendothelial components of the spleen. By inference much of the injected and circulating Pm^{147} may have been relatively diffusible.

The table shows that, in contrast to its depressant action on early uptake by spleen and enhancement of femur uptake of radioyttrium[4], cortisone treatment had no effect on Pm^{147} uptake by these tissues. However, these

[1] R. H. Follis, jr., Proc. Soc. exp. Biol. Med. *76*, 722 (1951).

[2] J. G. Hamilton, Rev. Mod. Phys. *20*, 718 (1948).

[3] H. Foreman and C. Finnegan, J. Biol. Chem. *226*, 745 (1957).

[4] B. Kawin, Nature *179*, 871 (1957).

Table I

Sequence of treatments following intravenous Pm^{147} injection ([a])

Treatment group \ Time	1	2	21	22	45	46	69	70	72
	Hours after Pm^{147} injection								
Controls	– No treatments –								Sacrifice
Cortisone([b])	Cortisone		Cortisone		Cortisone		Cortisone		Sacrifice
CaEDTA([c])		CaEDTA		CaEDTA		CaEDTA		CaEDTA	Sacrifice
Cortisone-CaEDTA	Cortisone	CaEDTA	Cortisone	CaEDTA	Cortisone	CaEDTA	Cortisone	CaEDTA	Sacrifice

([a]) $Pm^{147}Cl_3$, carrier-free, half-life 2·6 years. Dose: 12·5 μc/0·25 ml/animal, pH 3, in dilute NaCl.

([b]) Cortisone acetate. Dose: 50 mg/kg body weight, as 'Cortone' (Merck), 25 gm/ml with added suspending agents and 1·5% benzyl alcohol as preservative.

([c]) Calcium salt of 'Sequesterene' (Alrose Chemical). Dose 50 mg/0·5 ml/animal, pH 7·4.

Table II
Effects of Cortisone and CaEDTA on distribution of Promethium (Pm^{147})

Treatment Group \ Tissue[a]	Liver	Kidney	Spleen	Femur[b]	Plasma	Plasma Proteins
	Per cent Pm^{147}/tissue				Per cent Pm^{147}/ml	Per cent Pm^{147}/g
Controls, untreated	46·6 ± 4·6	0·82 ± 0·11	0·06 ± 0·05	1·13 ± 0·26	0·60 ± 0·51	0·03 ± 0·02
Cortisone	48·5 ± 11·8	1·00 ± 0·40	0·16 ± 0·07	1·08 ± 0·50	3·30 ± 1·62	0·05 ± 0·004
CaEDTA	37·5 ± 2·9*	1·22 ± 0·55	0·12 ± 0·08	0·98 ± 0·37	4·08 ± 1·25*	0·06 ± 0·01
Cortisone-CaEDTA	43·7 ± 12·0	1·03 ± 0·27	0·06 ± 0·05	1·06 ± 0·24	3·92 ± 2·23	0·001 ± 0·002

[a] Values are means from five animals expressed as per cent of administered dose of Pm^{147} ± standard deviation of the mean.
[b] Corrected for a measured mean value of 25 per cent for marrow weight.
* Compared to control group these differences were statistically significant with $P \leq \cdot 01$.

differences may be accounted for by dissimilarities in (a) duration of experimental periods, (b) cortisone administration-sacrifice interval, and (c) chemical natures of these radioelements.

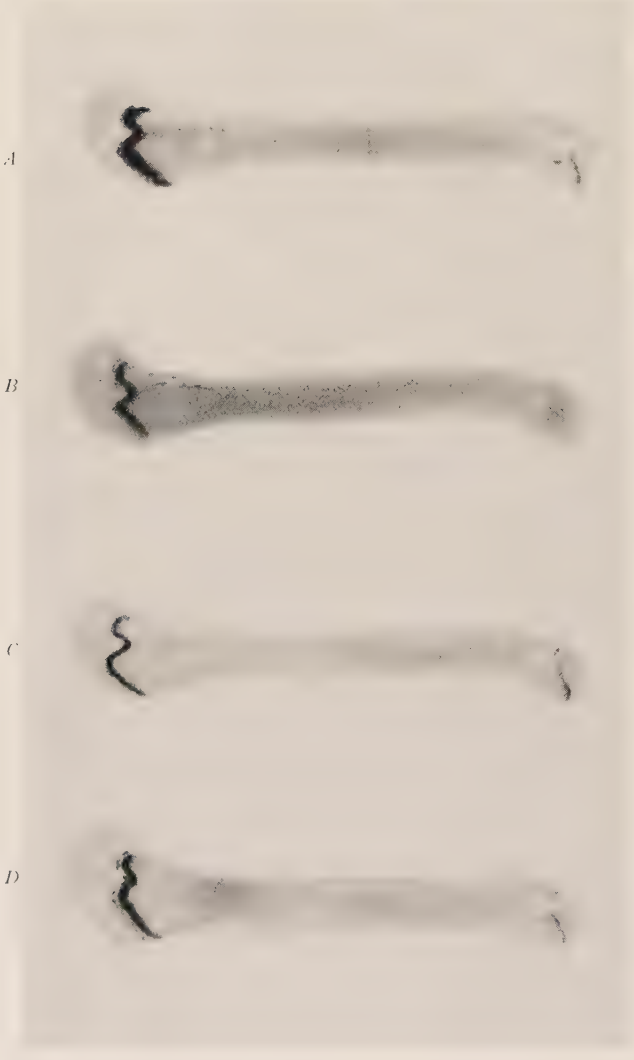


Fig. 1.—Autoradiograms of femurs from adult rats injected with promethium (Pm^{147}) and sacrificed at 72 hours (×10). Exposed 72 hours at 4° C on Noscreen X-ray film. *A*, untreated controls; *B*, CaEDTA treated; *C*, cortisone treated; *D*, CaEDTA-cortisone treated.

In each of the treated groups plasma concentration of Pm^{147} was increased several-fold compared to the control group. The Pm^{147} concentrations of the plasma proteins which accompanied these increases did not vary significantly from the control group values. Thus the enhanced plasma concentrations may have been dependent on increased concentrations of Pm^{147} not bound by plasma proteins.

Femur Localization. Autoradiograms of bones representative of each animal group are shown in Figure 1. In these figures the densities of deposited Pm^{147} were not quantitated, but the resolution obtained by equal times of exposure permits comparison of the localization of this radioelement.

The localization of Pm^{147} in a femur from the control group, shown in Figure 1 (*A*), is very similar to those reported earlier for other lanthanide elements[2]. The most intense deposition appeared to be in the zone of provisional calcification and in the region of the cancellous bone of the proximal epiphysis. These concentrations of Pm^{147} appeared to be separated by a band of much lower concentration in the region of the cartilaginous plate. In the region of the distal epiphysis Pm^{147} was concentrated to some extent in a single narrow transverse band. Throughout the femur shaft Pm^{147} was diffusely distributed in marrow and in the regions of the endosteal and periosteal surfaces. Deposition of presumably radiocolloidal Pm^{147} in the marrow region may have resulted in part from its uptake by reticuloendothelial cells[5]. However, the low spleen uptake of Pm^{147} suggests that this factor may account for only a small fraction of the distribution in marrow, as compared to its apparently greater role in bone marrow uptake of colloidal radiolanthanum[6].

The autoradiogram obtained from the CaEDTA treated animals is shown in Figure 1 (*B*). It indicates a localization of Pm^{147} very similar to that shown in the control femur autoradiogram.

After cortisone treatment alone Figure 1 (*C*) shows that the zone in the region of the epiphyseal plate in which Pm^{147} was localized appeared to be narrowed to some degree compared to the control femur localization. This slight modification of the Pm^{147} deposition is suggestive of the narrowing of the cartilaginous area of the epiphysis produced by cortisone administration, but establishment of a more definite relationship would require further investigation.

[5] C. W. Asling, J. G. Hamilton, D. J. Axelrod-Heller, and B. J. Louie, Anat. Rec. *113*, 285 (1952).
[6] D. Laszlo, D. M. Ekstein, R. Lewin, and K. G. Stern, J. Nat. Cancer Inst. *13*, 559 (1952).

The autoradiogram obtained after CaEDTA administration with cortisone, shown in Figure 1 (*D*), indicates a localization of Pm^{147} closely similar to that of the control femur.

The autoradiographic observations indicate no marked effect of cortisone and CaEDTA treatments on localization of Pm^{147} in femur. The concurrent lack of overall effect on the total amounts of Pm^{147} in the several tissues indicates that neither cortisone nor CaEDTA have significant therapeutic value for removal of internally deposited promethium from rats.

This paper is based on work performed under contract for the U.S. Atomic Energy Commission. Portions of the material in this paper were presented at the Fall Meeting, American Physiological Society, Rochester, N. Y., September 4-7, 1956.

B. Kawin[7]

Department of Agricultural Chemistry, Michigan State University, E. Lansing, March 4, 1958.

Zusammenfassung

Junge erwachsene weibliche Ratten, welche Einspritzungen von radioaktivem Promethium (Pm^{147}) erhalten hatten, wurden mit dem Kalziumsalz von Äthylendiamintetraessigsäure (CaEDTA) und/oder Cortison behandelt. Die Behandlungen vergrösserten die Blutkonzentrationen von Pm^{147} ein wenig. CaEDTA-Behandlung verkleinerte die Menge von Promethium in der Leber um 20%, aber in anderen typischen weichen Zellgeweben und im Schenkel veränderte keine der Behandlungen die allgemeine Verteilung von Pm^{147}. Das autoradiographische Bild zeigt, dass die örtliche Verteilung von Pm^{147} derjenigen von anderen lanthaniden Elementen ähnlich ist.

[7] Present address: Biology Operation, Hanford Laboratories, General Electric Company, Richland, Washington.

The Electrophoretic Distribution of Protein-Bound Carbohydrates in Asthma Bronchiale

To investigate the electrophoretic distribution of protein-bound carbohydrates (PBC) in cases with bronchial asthma, we studied 26 patients with this disease. For each case, electrophorograms of serum-proteins (stained with bromphenilblue) and of PBC (stained with P.A.S. according to Köiw[1] with our modification) were performed, together with the absolute eosinophil count. The routine laboratory results (blood count, sedimentation rate, urine, etc.) were normal.

No difference of interest was found in the serum protein patterns, but the analysis of the electrophoretic distribution of the PBCs gave unusual results. In 12 cases out of 26, the PBCs of the albumin-fraction were found to be definitely increased, while 11 of these cases had an eosinophil count of over 6% relat. The PBCs of the α-2-globulins were also increased in 12 cases, in no correlation to the eosinophilia. A (possibly compensatory) decrease of the β- and γ-globulin PBS fractions was observed. Our results are presented in the table.

The frequency of the so-called albuminotropic type of PBC distribution is evident. This observation offers a new point of view in the allergic etiological conception of asthma bronchiale. Usually, the antibodies (in allergies and infections) are supposed to travel with the γ-globulines. This is the case in urticaria, where increased protein-bound hexoses in this fraction are found[2].

The albuminotropic type is rather rare and can be seen in gravidity[3] and in a few infectious diseases[4], for example typhus abdominalis, where it is considered as a sign of anergy or loss of defence powers of the organism. As a rule, in asthma bronchiale, a slight increase of the protein-bound hexoses and serum mucoproteins is found[5].

As asthma bronchiale can be considered a powerful and long-lasting stress, exhaustion of the suprarenal (corticoid) activity is found very often. A low excretion of neutral 17-ketosteroids and reducing corticosteroids is usual[6]. Such a relative hypocortocoidism can be the cause of the albuminotropic (or anergic, exhaustive) type in the PBC distribution.

The difference between asthma bronchiale and other allergic conditions with regard to the therapeutic effect of antihistaminic drugs could possibly be explained by the electrophoretic differences in the antibodies.

J. Kellen and T. Kološ

Laboratory of the National Spa Novy Smokovec and Laboratory of the National Spa Štrbské Pleso (Czechoslovakia), June 3, 1958.

Zusammenfassung

Bei Asthma bronchiale wurde in annähernd der Hälfte der Fälle die Verteilung der Polysaccharidproteine nach dem «albuminotropen Typ» gefunden. Derselbe ist in der Regel bei allergischen Zuständen nicht vorhanden und kann als elektrophoretische Abweichung der Antikörper interpretiert werden.

[1] E. Köiw and A. Grönwall, Scand. J. clin. Lab. Invest. *4*, 244 (1952).

[2] F. Allergra, Arch. ital. dermatol. sifilogr. venerol. *28*, 36 (1956).

[3] Z. Stary, Hoppe-Seylers Z. *288*, 55 (1956).

[4] Z. Stary, F. Bursa, O. Kaleoglu, and M. Bilen, Med. Mschr. *7*, 497 (1953).

[5] F. Galletti and G. Gelli, G. Pneumologia I, *3*, 265 (1957).

[6] H. Leubner, F. Gabl, and I. Rabl, Allergie und Asthma *3*, 79 (1957).

	Electrophoretic patterns										Eosinophil count
	of proteins					of PBC					
Fractions	Albumin	α_1	α_2 globulins	β	γ	Albumin	α_1	α_2 globulins	β	γ	
No. of cases											
Increased	2	4	3	2	5	12	9	12	1	2	14 (>6%)
Decreased	2	2	2	5	2	3	3	2	9	8	
Normal	22	20	21	19	19	11	14	12	16	16	12

Über die Entstehung von Serotonin aus 5-Hydroxytryptophan nach UV.-Bestrahlung

Im Jahre 1927 äusserte Trendelenburg[1] auf Grund unveröffentlicher Befunde die Ansicht, dass manche in der Haut sich abspielenden Strahlenwirkungen ihre Erklärung in einer Entstehung von Histamin aus der in den Zellen der Haut vorhandenen Aminosäure Histidin finden könnten. Ellinger[2] griff diese Frage auf und konnte zeigen, dass bei der Bestrahlung von Histidinlösung mit UV.-Licht eine Substanz entsteht, die bei der Testierung am Blutdruck der Katze sowie am isolierten Meerschweinchen-Dünndarm in ihrer Wirkung von Histamin nicht zu unterscheiden ist. Der chemische Beweis für die Identität des Bestrahlungsproduktes mit Histamin wurde von Holtz[3] durch Darstellung des Pikrats, des Gold- und Platinsalzes bzw. deren Analyse erbracht.

Neuere Befunde deuten darauf hin, dass zumindest bei einzelnen Tierspezies dem Serotonin ähnliche Funktionen zukommen, wie sie allgemein bis dahin dem Histamin zugeschrieben wurden. Serotonin darf heute wohl mit Recht als zu den von Lewis[4] postulierten H-Substanzen gerechnet werden. Damit wird auch für Serotonin die Frage einer eventuellen Mitbeteiligung bei cutaner Strahlenwirkung aktuell. Es erschien uns deshalb interessant, die Möglichkeit einer Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan durch UV.-Strahlung zu untersuchen sowie gleichzeitig die quantitativen Verhältnisse dieses biologischen Entstehungsmodus der beiden Amine zu klären.

Methode. Für die Bestrahlung verwendeten wir eine «Belmag»-Lampe mit einer Leistung von 300 W. Als Ausgangssubstanzen benützen wir Histidinchlorid und 5-Hydroxytryptophan-Base je in $1^0/_{00}$iger Lösung. Alle Lösungen wurden in Petrischalen bei einem Lampenabstand von 30 cm dem UV.-Licht während $2^1/_2$, 5, 10, 20 und 40 min ausgesetzt. Die Schichtdicke der Lösungen betrug 2,5 mm, die pro Ansatz bestrahlte Menge etwa 20 ml. Die Petrischalen waren auf einer Waage montiert und die während der Bestrahlung durch Verdunstung auftretenden Wasserverluste wurden laufend durch Zugabe von aqua dest. kompensiert. Die Testierung der bestrahlten Lösungen auf ihren Gehalt an entstandenem Amin erfolgte im Falle des Histamins am isolierten Meerschweinchendünndarm, im Falle des Serotonins am isolierten Rattenuterus, wobei in beiden Fällen der von Schild[5] beschriebene «four point assay» zur Anwendung gelangte. Alle Angaben beziehen sich auf die freie Base.

Ergebnisse. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die von Ellinger für Histidin gefundene UV.-Decarboxylierung grundsätzlich auch für 5-Hydroxytryptophan möglich ist. Das dabei entstehende Serotonin war bei der Prüfung am isolierten Rattenuterus von synthetischem Serotonin nicht zu unterscheiden. Wie Abbildung 1 zeigt, liessen sich beide in gleichem Ausmass durch den spez. Serotonin-Antagonisten LSD-25 hemmen. Umgekehrt liess sich zeigen, dass beim Stehenlassen an der Luft und analogem Erwärmen sowohl im Falle des Histidin als auch des 5-Hydroxytryptophan keine nachweisbaren Mengen der entsprechenden Amine entstehen.

Zum quantitativen Vergleich wurden für beide Amine Zeitwirkungskurven aufgestellt. Die nach $2^1/_2$, 5, 10, 20 und 40 min Bestrahlungszeit entstandene Menge Histamin bzw. Serotonin wurde in Promille, bezogen auf die entsprechende Menge Aminosäure als Ausgangssubstanz, in

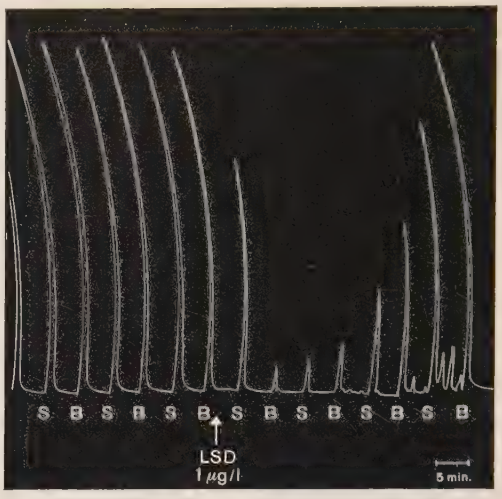


Abb. 1. Hemmung der durch wechselweise Zugabe äquivalenter Dosen Serotonin bzw. bestrahlter 5-Hydroxytryptophanlösung ausgelösten Kontraktionen des isolierten Rattenuterus mit LSD-25.
S: 0,5 µg Serotonincreatininsulfat.
B: 0,05 ml während 40′ bestrahlte 5-Hydroxytryptophanlösung $1^0/_{00}$.
Bad: 50 ml.

Abbildung 2 dargestellt. Es zeigt sich, dass bei logarithmischer Darstellung die Zeitwirkungskurven linear und, wie die statistische Prüfung ergab, auch parallel verlaufen. Pro Zeiteinheit geht jedoch die Decarboxylierung im Falle von 5-Hydroxytryptophan mit etwa 6,7mal grösserer Ausbeute vor sich.

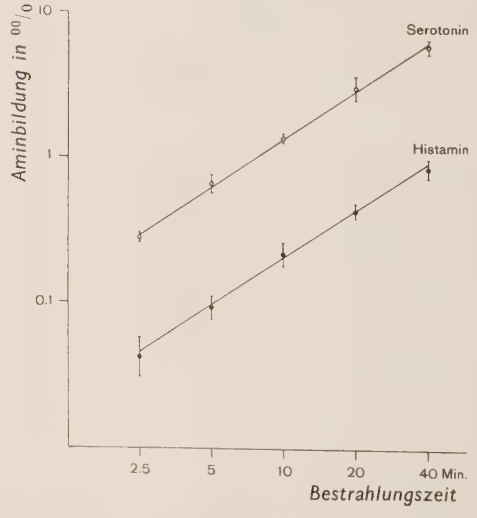


Abb. 2. Serotonin- bzw. Histaminbildung durch zunehmende UV.-Strahlenexposition von 5-Hydroxytryptophan – bzw. Histidinlösungen. Bestrahlung während 10 min von gleichen Mengen der beiden Aminosäuren (20 ml) führt beispielsweise zur Bildung von 4,0 µg Histamin, jedoch zur wesentlich höheren Menge von 26,8 µg Serotonin.

Diskussion. Wie die mitgeteilten Befunde zeigen, ist *in vitro* eine Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan durch UV.-Strahlung grundsätzlich möglich. Der im Vergleich zu Histidin zeitlich raschere Ablauf dieses Gesche-

[1] P. Trendelenburg, zitiert bei [2].
[2] F. Ellinger, Arch. exp. Path. Pharmakol. *136*, 129 (1928); Arch. exp. Path. Pharmakol. *149*, 343 (1930); Arch. exp. Path. Pharmakol. *153*, 120 (1930).
[3] P. Holtz, Arch. exp. Path. Pharmakol. *175*, 97 (1934); Klin. Wschr. *2*, 1613 (1933).
[4] T. Lewis, Heart *14*, 19 (1927–29).
[5] H. O. Schild, J. Physiol. *101*, 115 (1942).

hens bzw. die quantitativ bessere Ausbeute an biogenem Amin legen die Vermutung nahe, dass diesem Effekt auch *in vivo* eine gewisse Bedeutung zukommen könnte. Dies zumindest bei gewissen Tierspezies mit relativ hohem Tryptophan- bzw. 5-Hydroxytryptophangehalt der Haut. Gegen die von ELLINGER für Histidin mitgeteilten Befunde wurden später von BOURDILLON *et al.*[6] hinsichtlich ihrer Bedeutung bei physiologischer Sonnenbestrahlung Einwände erhoben. Bei Bestrahlung von Histidinlösung mit UV.-Licht verschiedener Wellenlänge zeigte sich nämlich, dass nur im Bereich unter 290 mμ eine Decarboxylierung eintritt, wobei das Optimum, wie zu erwarten, mit dem Absorptionsmaximum zusammenfällt. Da jedoch bei normaler Sonnenbestrahlung praktisch nur Strahlen von 290 mμ und länger die Erdoberfläche erreichen, ist eine Histaminneubildung auf diesem Wege ziemlich ausgeschlossen. Anders scheint es im Falle des Serotonin zu sein, dessen eines Absorptionsmaximum im Bereich der die Erdoberfläche erreichenden UV.-Strahlung liegt. Ob und wie weit Serotonin bei biologischen Strahlenwirkungen beteiligt ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

W. DOEPFNER und A. CERLETTI

Pharmakologisches Laboratorium, Sandoz AG., Basel, 26. Juli 1958.

Summary

UV.-irradiation of a 5-hydroxytryptophan solution results in formation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) the yield being higher than that of histamine in a histidine solution under similar conditions. The possible importance of these findings, for biological effects of UV.-irradiation is discussed.

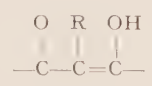
[6] R. B. BOURDILLON, J. H. GADDUM und R. G. C. JENKINS, Proc. roy. Soc. [B] *106*, 388 (1930).

Novobiocin as Uncoupling Agent

Following the early observation by HOTCHKISS[1] on gramicidin, several antibiotics and chemotherapeutics have been shown to be uncoupling *in vitro:* tetracycline group[2], usnic acid[3], atebrin[4]. Conversely, some uncoupling substances (dinitrophenols included) show antibacterial activity[5]. Although there is no definitive evidence of relationship between chemotherapeutic activity of these drugs and their ability to inhibit oxydative phosphorylation, indirect proofs make this hypothesis likely: usnic acid uncouples at the same concentration at which it exerts antibacterial activity[6]; both uncoupling[7] and antibiotic[8] actions of tetracyclines are counteracted by Mg ions[9].

Novobiocin has a bacterial spectrum similar to tetracyclines, and, like tetracyclines, its activity against Gram-negative bacteria can be counteracted *in vitro* by Mg ions[10]. Furthermore the metyl-coumarinic structure of novobiocin molecule leads us to relate this antibiotic to the anticoagulants coumarin and indandione derivatives which have shown to exert antibacterial[11] and uncoupling[12] activity.

Finally, it is to be pointed out that a group



is present in novobiocin, as well as in tetracyclines and in usnic acid molecule.

These facts suggested us to test novobiocin as uncoupling substance *in vitro*.

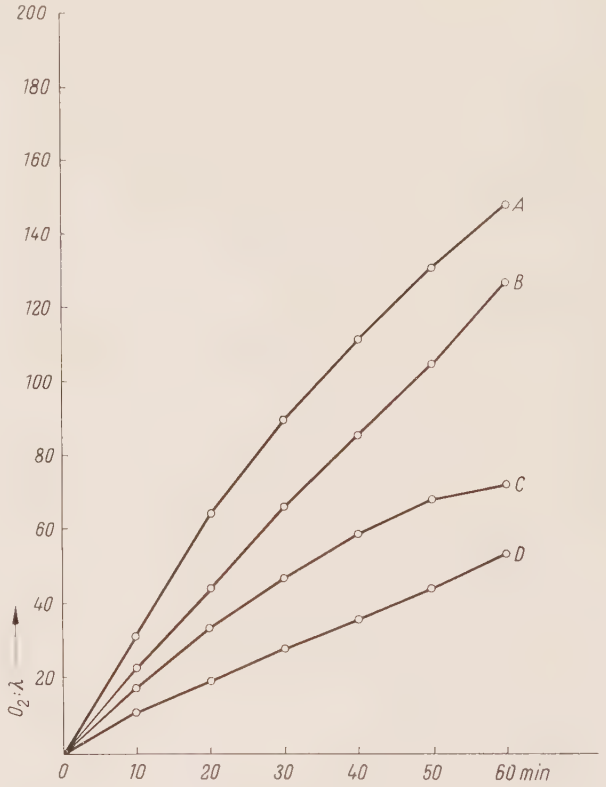


Fig. 1.—Effect of Novobiocin at different concentrations on the oxydation of Na alpha-ketoglutarate by rat liver homogenate. Novobiocin concentrations ($\times 10^{-4}M$): *A* control; *B* 0,787; *C* 1,575; *D* 7,878.

[1] R. D. HOTCHKISS, Advanc. Enzymol. *4*, 153 (1944).

[2] T. M. BRODY and J. A. BAIN, J. Pharmacol. *103*, 338 (1951). – T. M. BRODY, R. HURWITZ, and J. A. BAIN, Antib. Chemother. *4*, 864 (1954).

[3] R. B. JOHNSON, G. FELDOTT, and H. A. LARDY, Arch. Biochem. *28*, 317 (1950).

[4] W. F. LOOMIS and F. LIPMANN, J. Biol. Chem. *173*, 807 (1948).

[5] H. W. DALTON, Lancet *259*, 596 (1950). – G. IVANOVICS, Z. Immun. Forsch. *102*, 238 (1942). – R. LECOQ, J. SOLOMIDES, and P. LANDRIN, Ann. pharm. franç. *7*, 326 (1949).

[6] A. MARSHAK and J. HARTIG, J. cell. comp. Physiol. *31*, 321 (1948).

[7] T. M. BRODY, R. HURWITZ, and J. A. BAIN, Antib. Chemother. *4*, 864 (1954).

[8] M. HAMBURGER, J. CARLETON, and M. HARCOURT, Antib. Chemother. *7*, 274 (1957).

[9] The fact that some of the above mentioned antibiotics inhibit bacterial growth at a concentration considerably lower than that requested for depressing phosphorylation in mammal cell-free preparations, is probably due to a lesser sensitivity of tissue system in comparison with bacterial cells[13].

[10] T. D. BROCK, J. Bact. *72*, 320 (1956). – H. HOEKSEMA, E. L. CARON, and J. W. HINMAN, J. Amer. Chem. Soc. *78*, 2019 (1956).

[11] E. GORI, R. C. Ist. lombardo *86*, 667 (1953).

[12] C. MARTIUS and D. NITZ-LTZOW, Biochim. biophys. Acta *12*, 134 (1953). – J. P. GREEN, E. SONDERGAARD, and H. DAM, J. Pharmacol. *119*, 12 (1957). – U. SODERBERG and C. A. WACHTMEISTER, J. Pharmacol. *117*, 298 (1956).

[13] A. F. BRODIE and C. T. GRAY, J. Biol. Chem. *219*, 853 (1956). – D. F. HERSEY and S. J. AJL, J. gen. Physiol. *34*, 295 (1951). – G. B. PINCHOT, J. Biol. Chem. *205*, 65 (1953).

Methods. The oxydative phosphorylation has been tested on rat liver homogenate according to Krebs *et al.*[14], Na alpha-ketoglutarate beeing used as substrate. Incorporation of P^{32} into adenosin-nucleotide molecule has been measured as described by Frei[15]. Oxygen consumption was followed by conventional Warburg apparatus at 20° C for 60 min. Phosphorylation is expressed as per cent P^{32} incorporated into ATP–ADP, and oxydation as mm^3 O_2 taken up by the system at 10 min intervals. Novobiocin, at the indicated concentration, was tipped into the vessels at the beginning of the experience.

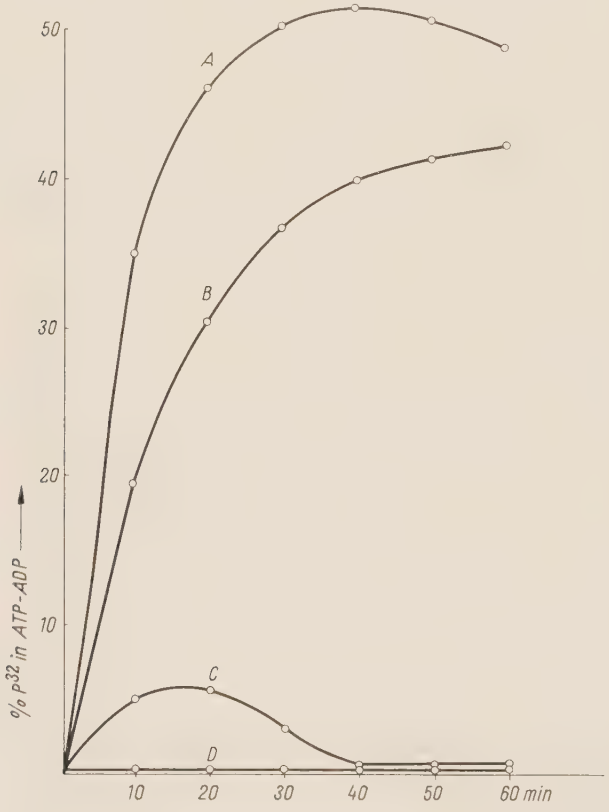


Fig. 2.—Effect of Novobiocin at different concentrations on P^{32} incorporation into ATP-ADP by rat liver homogenate, during oxydation of Na alpha-ketoglutarate. Novobiocin concentrations ($\times 10^{-4} M$): *A* control; *B* 0,787; *C* 1,575; *D* 7,878.

Results. Results of a typical experience are shown in Fig. 1 and 2. Starting from a concentration of $0{\cdot}787 \cdot 10^{-4}$ *M* novobiocin depresses both oxydation and phosphorylation. Nevertheless at $7{\cdot}878 \cdot 10^{-4} M$ phosphorylating activity disappears completely, while inhibition of oxygen consumption reaches about 70%.

Novobiocin can thus be included among uncoupling antibiotics. For the previously mentioned reasons we cannot say whether its antibacterial activity is related to its uncoupling action. Further investigations are needed to confirm it: chiefly about antibacterial/uncoupling concentration ratio, and Mg ions importance in counteracting the uncoupling activity.

J. Frei, N. Canal, and E. Gori

Clinique Médicale Universitaire, Lausanne, and Istituto di Farmacologia dell'Università, Milano, June 26, 1958.

[14] H. A. Krebs, A. Ruffo, M. Johnson, L. V. Eggleston, and R. Hems, Biochem. J. *54*, 107 (1953).

[15] J. Frei, A. Vannotti, and P. Lerch, Exper. *12*, 193 (1956).

Résumé

Les auteurs démontrent que la novobiocine provoque un découplement de l'oxydation phosphorylante dans un homogénat de foie de rat déjà à une concentration $1{,}575 \cdot 10^{-4} M$. Les rapports entre l'activité antibactérienne et l'action biochimique de l'antibiotique sont discutés.

Zur Pharmakologie von Psilocybin, einem Wirkstoff aus *Psilocybe mexicana* Heim

Vor kurzem gelang die Isolierung des wirksamen Prinzips aus dem mexikanischen Rauschpilz *Psilocybe mexicana* Heim[1]. Die in kristalliner Form erhaltene, als Psilocybin bezeichnete Substanz, welche am Menschen die gleichen psychotropen Effekte entfaltet wie der Pilz selbst, wurde als ein phosphorhaltiges Indolderivat charakterisiert[1]. Wir hatten Gelegenheit, diesen interessanten Körper pharmakologisch zu untersuchen und möchten über das Ergebnis in kurzer Form berichten.

1. *An isolierten Organen* (Samenblase, Dünndarm und Herzvorhof des Meerschweinchens sowie Uterus der Ratte) hat Psilocybin keine charakteristische Eigenwirkung in Konzentrationen bis 10^{-5}. Ebenso weist der Stoff gegenüber den durch Adrenalin, Acetylcholin, Histamin und Nikotin ausgelösten Effekten keinen oder höchstens einen im Vergleich zu spezifisch wirksamen Verbindungen unbedeutenden Antagonismus auf. Nur gegenüber Serotonin zeigt Psilocybin einen nennenswerten, in der Grössenordnung synthetischer Indolderivate, wie zum Beispiel des 2-Methyl-3-äthyl-5-dimethylaminoindol (Medmain)[2] liegenden Antagonismus.

2. *Die Kreislaufwirkung* von Psilocybin wurde an Hunden in Numal- und an Katzen in Urethan-Chloralose-Narkose untersucht. Die Befunde weisen auf charakteristische Unterschiede in der Reaktion der beiden Tierspezies hin und können im wesentlichen wie folgt präzisiert werden: Hunde reagieren auf 0,05–0,1 mg/kg Psilocybin i. v. mit einem mässigen, aber anhaltenden Blutdruckabfall, einer Tachykardie und einer aktiven Verminderung des Nierenvolumens.

Demgegenüber zeigen Katzen bei Verwendung ähnlich grosser Dosen einen meist geringgradigen, vereinzelt aber doch beträchtlichen kurzdauernden Blutdruckanstieg, eine Bradykardie und eine aktive Zunahme des Nierenvolumens. Höhere Dosen führen aber auch bei dieser Tierart zu anhaltenden depressorischen Effekten. Charakteristisch ist bei der narkotisierten Katze eine bereits durch niedrige Dosen Psilocybin ausgelöste kräftige Nickhautkontraktion. Diese komplexen Wirkungen des Psilocybin am Kreislauf bezüglich peripherer, zentraler und reflektorischer Komponenten sollen in einer späteren Arbeit eingehend besprochen werden.

3. *Wirkung am wachen Tier.* Besonders hervorstechend ist die Psilocybin-Wirkung auf Körpertemperatur und Pupille. Bei der Maus werden relativ hohe Dosen von mindestens 10 mg/kg s.c. benötigt, um eine deutliche, 1–2 h anhaltende Mydriase und Piloerektion hervorzurufen. Bedeutend empfindlicher reagiert das wache Kaninchen, welches bereits nach 1 mg/kg i.v. Pupillenerweiterung, Tachykardie, Atmungsbeschleunigung und Temperatursteigerung zeigt. Bei quantitativer Differenzierung erwiesen sich bereits 0,02 mg/kg Psilocybin i.v. pyretogen wirk-

[1] A. Hofmann, R. Heim, A. Brack und H. Kobel, Exper. *14* (3), 107 (1958).

[2] E. Shaw und D. W. Woolley, J. Pharmacol. *111*, 43 (1954).

sam; Steigerung der Dosis führt jedoch nur zu einer geringen Wirkungszunahme (zum Beispiel 2 mg/kg i.v. + 0,7° C). Zur Erzielung einer signifikanten Erhöhung des Blutzuckerspiegels werden höhere Dosen (3 mg/kg s.c.) benötigt.

Ganz im Gegensatz zu diesen Anzeichen einer vegetativen Stimulation steht das motorische Verhalten der Versuchstiere. Eine erregende Wirkung in dieser Hinsicht fehlt vollständig – im Gegenteil, höhere Dosen wirken eher beruhigend auf die Versuchstiere. Nach 10 und 50 mg/kg s.c. ist die im Lichtschrankenkäfig gemessene Aktivität der Maus deutlich vermindert. Beim Kaninchen tritt nach 1–3 mg/kg i.v. manchmal eine gewisse Sedation in Erscheinung. Nach 10 mg/kg per os scheinen auch Affen leicht beruhigt zu sein. Die nach Cardiazol und Elektroschock auftretenden Krampferscheinungen bei der Maus werden durch Psilocybin nicht sicher beeinflusst.

4. *Wirkung auf das EEG und die spinalen Reflexe.* Beim curarisierten Kaninchen bewirken Dosen von 1–2 mg/kg Psilocybin i.v. in der frontalen und parietalen Ableitung ein niedervoltiges Corticogramm mit vorwiegendem 4–5 Rhythmus bei gleichzeitig fast völligem Verschwinden der Spindel-Aktivität und der langsamen Wellen. Phänomenologisch erinnert dieses Bild an das Wach-EEG, bzw. an die Aktivierungserscheinungen, wie sie nach zentralen sympathischen Stimulantien beobachtet werden.

Der Patellarsehnenreflex wird an der intakten und an der Spinal-Katze nach Psilocybin (0,02–1 mg/kg i. v.) durchwegs verstärkt. Beim Flexorreflex (*N. tibialis – M. tibialis ant.*) weicht die in niedrigen bis mittleren Dosen (0,02–0,1 mg/kg i. v.) dominierende geringgradige Verstärkung im höheren Dosenbereich einer Hemmung. Die durch Erregung motorischer Nerven ausgelöste Muskelkontraktion wird durch Psilocybin nicht beeinflusst.

Als Maßstab für den reflektorischen Aktivitätszustand darf auch die Reaktionszeit von Mäusen auf der Wärmeplatte herangezogen werden. Psilocybin (50 mg/kg s.c.) führt in diesem Test zu einer Verkürzung der Reaktionszeit, das heisst des Zeitintervalles vom Aufsetzen der Tiere auf eine 50° C heisse Platte bis zum Auftreten der ersten Schmerzsymptome (Fusslecken und Tanzen). Diese Dosis von Psilocybin hebt auch die durch Morphin hervorgerufene Verlängerung der Reaktionszeit der Tiere auf.

Psilocybin, das an isolierten Strukturen (Darm, Uterus, Herz) keine typischen Effekte entfaltet, löst *in vivo* charakteristische vegetative Wirkungen aus: Mydriase, Piloerektion, Tachykardie, Tachypnöe, Hyperthermie, Hyperglykämie, Blutdruckanstieg und Nickhautkontraktion. Die Mehrzahl dieser Wirkungen dürfen als Folge einer zentralen Erregung sympathischer Strukturen aufgefasst werden. Direkte Anhaltspunkte für eine zentrale Wirkung ergeben die Veränderungen im EEG und auch die Beeinflussung spinaler Reflexe. Im Gegensatz zu diesem diskreten Erregungssyndrom steht das motorische Verhalten der Tiere, welches im allgemeinen eher gedämpft wird.

H. Weidmann, M. Taeschler
und H. Konzett

Pharmakologisches Laboratorium, Sandoz AG., Basel, 1. August 1958.

Summary

The active principle of *Psilocybe mexicana* Heim, Psilocybin, is without marked effects on the isolated organs (seminal vesicle, intestine and auricle of the guinea pig; rat uterus) but exerts an action *in vivo* which resembles a slight sympathetic stimulation. In unanaesthetized rabbits it produces mydriasis, tachycardia, tachypnea, hyperthermia and hyperglycemia, in unanaesthetized mice mydriasis and piloerection. The EEG (curarized rabbits) after 1–2 mg/kg Psilocybin shows an alerting pattern (disappearance of spindle activity and of slow waves). Spinal reflexes of the cat are predominantly enhanced. However, the motor activity of mice, rabbits and monkeys is unaffected or even slightly depressed. In anaesthetized cats and dogs Psilocybin affects blood pressure and heart rate, the effect depending on dosage and species.

Autoradiographische Untersuchungen zur Frage des Eiweißstoffwechsels in den lymphoretikulären Organen

Vorliegende Arbeit greift von seiten des Eiweißstoffwechsels vier aktuelle Themen der Milzforschung[1] auf: 1. Follikelzentren, 2. Follikelrandzonen, 3. Basophileninseln und 4. Sinusendothelien.

Tabelle I gibt eine Übersicht über die Versuchstiere und die Durchführung der Versuche. Die Tiere waren gesund und normal ernährt. Sie erhielten durch Magensonde biosynthetisch gewonnene, S^{35}-markierte Thioaminosäuren oder Hefeeiweiss von hoher spezifischer Aktivität. Die Organe (Milz und Mesenteriallymphknoten) wurden bei Tier 1–3 mit Carnoy und bei Tier 4–9 mit 6% Formol-0,5% Trichloressigsäure fixiert und in der üblichen Weise zu Paraffinschnitten verarbeitet. Jeder zweite Schnitt diente zur Herstellung eines Autoradiogramms nach dem Verfahren von Pelc und Boyd (Stripping-Film). Die jeweiligen Folgeschnitte wurden zur Kontrolle mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Der grösste Teil der Autoradiogramme wurde überdies anschliessend an die photographische Entwicklung mit Hämalaun nachgefärbt.

Die verabreichten S^{35}-Thioaminosäuren werden im wesentlichen in das Eiweiss der Organe eingebaut. Über den Stellen des Schnitts, an denen eine Eiweiss-Synthese stattgefunden hat, zeigt sich in der Photoschicht des Autoradiogramms eine Schwärzung, wobei die Dichte der Silberkörner ein Mass für den Eiweissumsatz (bezogen auf Thioaminosäuren) ist. In Verbindung mit chemischen Untersuchungen kann auch die absolute Grösse des Thioaminosäureumsatzes bzw. die mittlere Lebensdauer der eiweissgebundenen Thioaminosäuren angegeben werden. Diese Verfahren sind an anderen Stellen ausführlich beschrieben worden[2]. Über die Ergebnisse, d. h. die Grösse des Thioaminosäureumsatzes in den lymphoretikulären Organen, hoffen wir in absehbarer Zeit berichten zu können.

Der Kapselbalkenapparat von Milz und Lymphknoten weist im Autoradiogramm ebenso wie das retikuläre Grundgerüst der Pulpa eine nur minimale Schwärzung auf. Das gleiche gilt von den Gefässen und ihrem Inhalt. Die subkapsuläre Zone der roten Milzpulpa hebt sich als stärker geschwärzter Randstreifen von der darunterliegenden, insgesamt schwächer geschwärzten interfollikulären Zone ab.

[1] F. Tischendorf, Milz, Handbuch der Zoologie 8, 5. Teil, 1 (Walter de Gruyter & Co., Berlin 1956); Naturwissenschaften *10*, 310 (1957); Riv. Anat. Pat. Onc. *13*, 128 (1957); Acta Neurovegetativa *17*, Heft 3–4, 386 (1958).

[2] W. Maurer, A. Niklas und G. Lehnert, Biochem. Z. *326*, 28 (1954). – A. Niklas und W. Oehlert, Ziegl. Beitr. *116*, 92 (1956). – W. Maurer, Wien, Z. inn. Med. *38*, 393 (1957). – A. Niklas, E. Quincke, W. Maurer und H. Neyen, Biochem. Z. *330*, 1 (1958).

Tabelle I

Versuch Nr.	Tierart	Geschlecht	Körpergewicht g	Versuchsdauer h	Verabreichtes Präparat	Applizierte Dosis mC
1	Maus	♂	31	6	S^{35}-Methionin	0,5
2	Maus	♂	32	24	S^{35}-Methionin	0,6
3	Maus	♂	27	17	S^{35}-Methionin	1,0
4	Ratte	♂♀	200	1,5	S^{35}-Hefehydrolysat	12,0
5	Ratte	♂	260	10	S^{35}-Hefehydrolysat	30,0
6	Ratte	♀	200	11	S^{35}-Hefehydrolysat	22,0
7	Ratte	♀	155	3	S^{35}-Hefehydrolosat	12,5
8	Kaninchen	♀	2500	8	S^{35}-Hefehydrolysat	100,0
9	Kaninchen	♂	2545	3	S^{35}-Hefehydrolysat	95,0

Die Malpighischen Körperchen der weissen Milzpulpa lassen auch im Autoradiogramm meist den bekannten konzentrischen Aufbau erkennen (Abb. 1): Im Inneren einen intensiv geschwärzten Follikelkern, darum eine erheblich hellere Follikelschale und anschliessend eine wieder stärker geschwärzte Randzone. Die Schwärzung über den Zentren der Milzfollikel sowie der Rindenknötchen der Lymphknoten entspricht, dem gefärbten Vergleichspräparat nach zu urteilen, vornehmlich grossen jugendlichen Lymphozyten und Makrophagen. Beide haben im Gegensatz zu den kleinen Lymphozyten der Follikelschale einen hohen Thioaminosäureumsatz. In den Follikelzentren der lymphoretikulären Organe werden offensichtlich sowohl Lymphozyten gebildet als auch zerstört, das heisst, die Zentren fungieren zugleich als Keim- und Reaktionszentren.

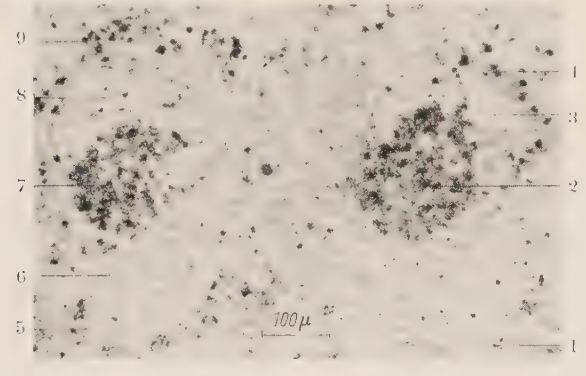


Abb. 1. Zwei Malpighische Körperchen aus der weissen Milzpulpa der Ratte (Versuch Nr. 5, Tabelle I), 6% Formol-0,5% Trichloressigsäure, Paraffin 3 µ; *Autoradiogramm*, Mikrophoto: 1,5,9 Follikelrandzone; 2,6,8 Follikelschale; 3,7 Follikelkern; 4 rote Pulpa.

Die Schwärzung über der perifollikulären Zone rührt ebenfalls zum Teil von grossen Lymphozyten her. In der Tat ist die Lymphopoese keineswegs auf die «Keimzentren» beschränkt, sondern findet regelmässig auch in der Follikelrandzone und zeitweilig sogar in der roten Pulpa selbst statt. Daneben bezieht sich die Schwärzung der Knötchenrandzone aber auch auf an Ort und Stelle entstandene Eosinophile, Plasmazellen, Monozyten und (Erythro-) Phagozyten. Besonderes Interesse verdienen die Plasmazellen, die als Produzenten der γ-Globuline für die Antikörperbildung verantwortlich zu machen sind[3].

Im Autoradiogramm der Mäusemilz ist die interfollikuläre Zone der roten Pulpa von zahlreichen stärker geschwärzten Partien durchsetzt. Es handelt sich, dem Hämalaun-Kontrollpräparat zufolge, um Anhäufungen plasmo- und lymphozytärer Elemente, die sogenannten Basophileninseln. Sie sind beim unbehandelten Tier erheblich schwächer ausgebildet als bei den Versuchstieren. Hier ähnelt das Bild demjenigen beim Mamma-Karzinom der Maus[4]. Der Grund dafür dürfte eine Strahlenbeeinflussung des Milzparenchyms durch die bei der Autoradiographie unvermeidlichen hohen S^{35}-Aktivitäten sein. Auch Untersuchungen an anderen Organen[5] ergaben stets über basophilen Elementen, Zellen mit hohem Ribonukleinsäuregehalt also, eine starke Schwärzung. Dies entspricht der bekannten Proportionalität zwischen dem Ribonukleinsäuregehalt einer Zelle und der Höhe der Eiweiss-Synthese (Casperson und Brachet).

Über dem Sinusendothel der roten Pulpa variiert die Silberkorndichte auch innerhalb kurzer Strecken erheblich. Die Grösse des Thioaminosäureumsatzes ist also im Bereiche der Sinusendothelien zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht allerorts die gleiche. Das passt durchaus zu dem rhythmischen Höhenwechsel und den an apokrine Sekretion erinnernden Abschnürungsvorgängen des Sinusendothels, die bei der Ergänzung bestimmter Bluteiweisskörper, vielleicht auch beim Thrombozytennachschub eine Rolle spielen[6].

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

F. Tischendorf und A. Linnartz-Niklas

Anatomisches Institut und Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln, 7. Juli 1958.

Summary

The size of protein-metabolism in lympho-reticular organs (spleen and lymph-nodes) is examined by means of autoradiography. Mice, rats and rabbits were fed with S^{35}-labelled thioamino-acids. The density of the silver grains in the autoradiographs allows a statement about the size of proteinmetabolism in relation to thioamino-acids. From this point of view the problem of the germinal centres and marginal zones of the Malpighian follicles, the «Basophileninseln» in the red pulp and the endothel of the splenic sinuses is discussed.

[3] W. E. Ehrich, Verh. Ges. dtsch. Naturf. Ärzte *98*, 69 (1955).

[4] H. Hoepke, Mikroskopie *10*, 268 (1956).

[5] A. Niklas und W. Oehlert, Ziegl. Beitr. *116*, 92 (1956).

[6] M. Watzka, Z. mikr.-anat. Forsch. *41*, 498 (1937).

Beobachtungen über die Phototaxis und die Thermotaxis des blinden Höhlenfisches *Caecobarbus geertsi* Blgr (Cyprinidae)

In früheren Untersuchungen des Verfassers wurde festgestellt, dass die blinde Barbe *Caecobarbus geertsi* lichtempfindlich ist und leicht negativ phototaktisch reagiert[1]. Eine Reise in den unteren belgischen Kongo (1956) ermöglichte es dem Verfasser, einige Höhlen in der Nähe von Thysville zu besuchen, welche die einzigen bisher bekannten Biotope von *Caecobarbus* sind, um die Laboratoriumsbefunde durch Beobachtungen in der natürlichen Umgebung des Fisches zu ergänzen.

In der Natur können die Blindfische nur dann phototaktisch reagieren, wenn sie in Höhlen leben, in denen an bestimmten Stellen überschwellige, mit der Dunkelheit kontrastierende Lichtreize vorkommen. In den meisten Fällen ist der Höhleneingang die einzige Stelle, an der die Tiere aus den vollkommen dunklen inneren Regionen allmählich in das volle Tageslicht schwimmen können. In einem solchen System gibt es einen Lichtgradienten, auf dem die Lichtintensität von Null bis zu einem Maximum ununterbrochen variiert.

Am Eingang der sogenannten Kavuaya-Höhle (ungefähr 10 km von Thysville in Richtung Kolo) waren derartige Beleuchtungsverhältnisse zu finden. An dieser Stelle erstreckt sich der Lichtgradient auf ungefähr 20 m; hier konnte man eine ziemlich grosse Anzahl von *Caecobarbus* (insgesamt 43 zur Beobachtungszeit) in den verschiedenen miteinander verbundenen Wasserlachen langsam herumschwimmen sehen. Licht- und Temperaturmessungen wurden an diesem Ort bei Tag und bei Nacht ausgeführt und das Verhalten der Tiere, das heisst ihre Verteilung auf dem Gradienten, gleichzeitig notiert.

Es gibt also im Anfangsteil der Höhle einen Beleuchtungsgradienten und einen Temperaturgradienten, die in entgegengesetzten Richtungen variieren (Abb. 1 *a* und *b*).

Wie schon gesagt, bestand die geringe *Caecobarbus*-Bevölkerung aus 43 Individuen, von denen 29 zwischen 2 und 3 cm lang waren, während die übrigen 14 mindestens 4 cm massen und sich deutlich von der ersten Gruppe unterschieden. Letztere werden aus praktischen Gründen als «Adulte» bezeichnet; über das Wachstum von *Caecobarbus* ist nichts Sicheres bekannt.

Resultate

Entfernung vom Eingang [*m*]	Lichtintensität [*lx*]	Temperatur [° C]	«Adulte» Fische*	Jungfische *
	Messungen bei Tag			
20	0	22,6	+	+
12	0	22,5	+	+
10	0	22,1	+	+
7,5	1,5	22	+	+
5	8	21,6	+	+
1	49	21,4	–	+
Volles Tageslicht	49 **	21,4	–	+
	Messungen bei Nacht			
20	0	22,8	+	+
12	0	22,2	+	+
10	0	22,2	+	+
7,5	0	22,8	+	+
5	0	21,8	–	–
1	0	21,6	–	–
Volles Nachtlicht	0	21,6	–	–

* + anwesend; – abwesend.

** Diese relativ schwache Lichtintensität ist darauf zurückzuführen, dass der Höhleneingang von Unterholz umgeben war.

Am Tage konnte man die jungen Blindfische in allen Teilen des Licht- und Temperaturgradienten beobachten; im Gegensatz dazu blieben die «Adulten» immer ungefähr 5 m vom Höhleneingang, also vom vollen Tageslicht entfernt. In dieser Zone betrug die Beleuchtung etwa 8 lx und die Temperatur 21,6° C (Abb. 1).

Bei Nacht zeigten die Beobachtungen, dass alle Fische unabhängig von ihrer Grösse in der Höhle blieben und eine bestimmte Grenze niemals überschritten. Diese Grenze lag zwischen 5 und 7,5 m vom Eingang, wo die Temperatur zwischen 22,8° C und 21,8° C betrug.

Da in der Dunkelheit von Phototaxis keine Rede mehr sein konnte und da die Strömung wahrscheinlich zu

[1] G. Thines, Ann. Soc. zool. Belg. *85*, I, 35 (1954).

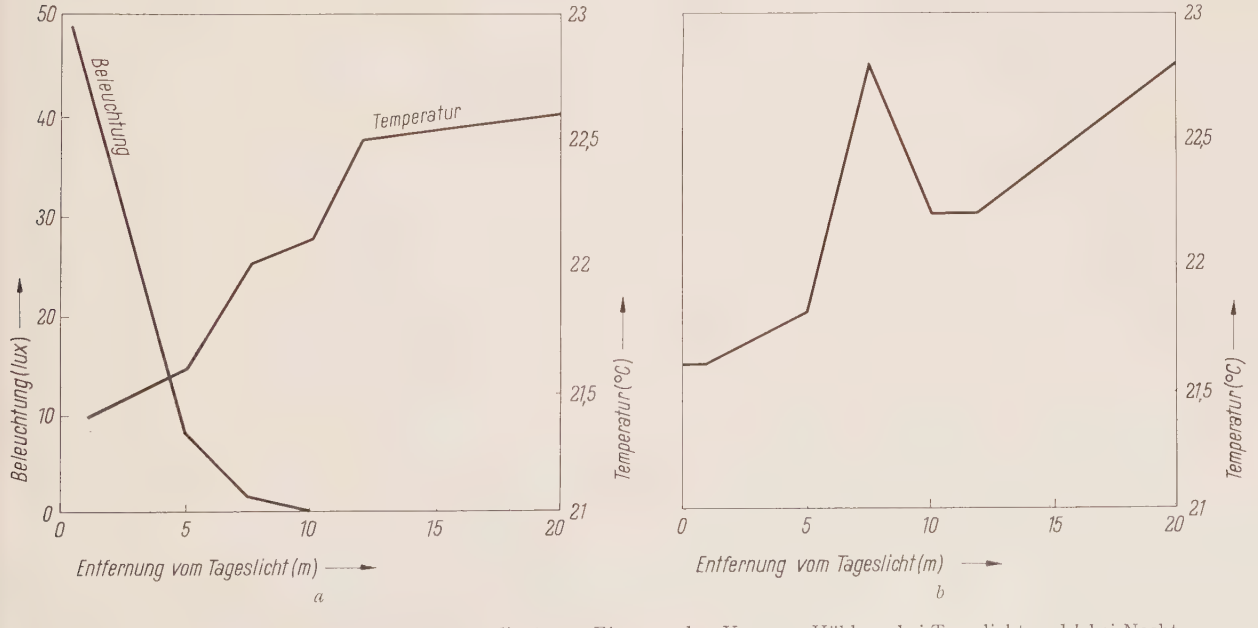


Abb. 1. Beleuchtungs- und Temperaturgradient am Eingang der Kavuaya-Höhle; *a* bei Tageslicht und *b* bei Nacht.

schwach war, um eine bestimmte Rheotaxis zu erzeugen, erscheint es richtig, die Temperatur als die wichtigste Variable und folglich das Verhalten der Tiere bei Nacht als eine Thermotaxis zu betrachten.

Der Befund gibt Anlass zu folgenden Betrachtungen:

1. Die Tatsache, dass die Jungfische niemals auf Lichtreize, wohl aber auf Temperaturunterschiede reagieren, weist darauf hin, dass sich die Phototaxis bei diesen Höhlentieren in der Ontogenese später zu entwickeln scheint als die Thermotaxis[2]. 2. Da eine Thermotaxis der jungen Tiere nur bei Nacht zu beobachten war, erscheint es möglich, dass diese Reaktion in Verbindung steht mit Tag- und Nachtrhythmen. 3. Dass die Jungfische im Tageslicht nicht photonegativ sind, dürfte auch mit der Futtersuche zusammenhängen. Die Futtermenge ist bei den beleuchteten Zonen wahrscheinlich grösser als in den dunkleren. Ein ähnlicher Konflikt zwischen Lichtreaktion und Futtersuchen ist schon von anderen Blindfischarten bekannt[3], und dieses Verhalten wäre bei Jungfischen um so eher zu verstehen, als man es hier mit wachsenden und somit relativ viel fressenden Tieren zu tun hat. 4. Die Lichtindifferenz der jungen *Caecobarbus* muss als ein Einwand gegen die postulierte biologische Bedeutung der negativen Phototaxis bei den Höhlenfischen[4] betrachtet werden, denn diese Lichtreaktion fehlt gerade dann, wenn sie am vorteilhaftesten wäre.

Wir danken dem Institut für wissenschaftliche Untersuchungen in Zentralafrika (I.R.S.A.C.) herzlich für die Ermöglichung dieser Beobachtungen.

G. Thines*

Universität Löwen (Belgien), 2. Juli 1958.

Résumé

L'observation de la phototaxie et de la thermotaxie du poisson aveugle *Caecobarbus geertsi* Blgr (Cyprinidae) dans son environnement naturel montre qu'il existe certaines différences entre les réactions des formes jeunes et celles des formes plus âgées. Observées pendant le jour sur le gradient d'éclairement situé à l'entrée de la grotte occupée par les poissons, les formes jeunes restent indifférentes à l'excitation de la lumière solaire, tandis que les formes plus âgées manifestent une phototaxie négative lorsque l'éclairement atteint environ 8 lx. Observés la nuit, tous les poissons de la population étudiée, quel que soit leur degré de développement, se maintiennent à l'intérieur d'une zone thermique dont le minimum se situe entre 22,8° et 21,8° C. Quelques hypothèses sont proposées pour tenter d'expliquer ces phénomènes.

[2] Bei 3 Monate alten *Anoptichthys jordani* fand Kähling, dass diese jungen Fische wesentlich schlechter auf Lichtreize reagierten als adulte Tiere der gleichen Art. J. Kähling, Dissert. (Köln 1957). Noch unveröffentlicht.

[3] F. Angel, Bull. Mus. Hist. Nat. Paris, 2e série, *21* [1], 56 (1949). – Bridges, Anim. Kingd. *46* [4], 82, 87 (1943).

[4] C. M. Breder, Jr. und P. Rasquin, Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. *89*, 328 (1947). – G. Thines, Ann. Soc. zool. Belg. *85*, I, 35 (1954).

* Chercheur qualifié F.N.R.S. Chargé de mission de l'I.R.S.A.C.

Biotin Deficiency in the Hamster

Biotin deficiency has been produced in various laboratory animals by the incorporation of egg white into the diet. Among the deficiency symptoms described for the rat (Sullivan and Nicholls[1]) and the mouse (Wilson *et al.*[2]) are alopecia, achromotrichia, dermatitis and retarded growth. The data on the biotin requirement of the hamster are inconclusive. Schweigert[3] and Hamilton and Hogan[4] were unable to establish a definite need. Cooperman *et al.*[5], employing a diet lacking in biotin, observed retarded growth and dermatitis which were alleviated following administration of 1 microgram of biotin daily.

In an investigation of the relationship between the integument and the distribution of an ectoparasite, *Demodex* sp., of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*, an attempt was made to alter the environment of the parasite by producing a biotin deficiency. Reported here are the effects of the deficiency in the hamster with emphasis on those which pertain to the skin and hair.

Table I.—Composition of diets given in grams of dry ingredients and cubic centimeters of liquid ingredients

	DIET	
	I	IC
Vitamin-test casein	7·5	30·0
Egg white	40·0	0·0
Cornstarch (Argo)	21·3	29·0
Crisco	15·0	20·0
Corn oil (Mazola)	3·0	4·0
Cod liver oil	1·5	2·0
Powdered brewer's yeast (GBI)	6·0	8·0
Salt mixture USP XII, No. 2 (GBI)	5·2	7·0
Sulfaguanidine	0·5	0·0

Experimental. Two diets were employed (Table I): test diet I supplemented with sulfaguanidine and containing 40% egg white, and control diet IC lacking these ingredients. All animals were from litters of the thirteenth to fifteenth generations of brother-sister matings. 72 hamsters were isolated and weaned at 18 days of age on test diet I available ad libitum; similarly 33 littermates were introduced and maintained on control diet IC. During development of the deficiency various areas of the dorsum were plucked to observe the effects on hair growth; biopsies were taken frequently for histological examination. In order to establish the presence of a true biotin deficiency animals exhibiting extreme symptoms received daily intraperitoneal injections of 4 micrograms of biotin while being maintained on the test diet.

Results. The development of the deficiency is summarized in Table II. The test diet appears to allow for rapid depletion of biotin stores so that by 6 weeks extreme deficiency is apparent. The gain in weight by this time is less than half of that of control animals. The animals are scrawny and exhibit the characteristic kangaroo stance. Other symptoms of advanced deficiency include nervousness and irritability, jerky movements and a tendency to drag the hind legs. The skin is dry and scaly. The nose and mouth are swollen and the eyes are usually sealed shut with incrustations. Although the animals are almost entirely hairless, tufts or patches of short hairs may be scattered over the dorsum. Individual tufts persist for a short time, elongating at the normal rate of

[1] M. Sullivan and J. Nicholls, Arch. Derm. Syph. N. Y. *45*, 295 (1942).

[2] J. W. Wilson, E. H. Leduc, and D. H. Winston, J. Nutr. *38*, 73 (1949).

[3] B. S. Schweigert, Vitam. and Horm. *6*, 55 (1943).

[4] J. W. Hamilton and A. G. Hogan, J. Nutr. *27*, 213 (1944).

[5] J. M. Cooperman, H. A. Waisman, and C. A. Elvehjem, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *52*, 250 (1943).

Table II.—Summary of development of biotin deficiency symptoms through 6 weeks on test diet

Weeks	Symptoms
2	Dull rough coat
3	Slight achromotrichia
4	Slight alopecia on ventrum
	Coat light colored
	Incrustations about eyes
5	Ventrum bare
	Coat very light colored
	Bare patches on hind dorsum
	Nose and mouth swollen
	Eyes sealed shut
	Jittery, jerky movements
	Kangaroo stance
6	Complete alopecia

approximately 1 mm per day and finally disappearing at about the time full length is attained. The hairs are consistently lighter in color than the normal coat.

Injections of 4 micrograms of biotin per day quickly alleviate the symptoms. During the first week the dermatitis, the swelling of nose and mouth and the incrustations about the eyes disappear; this is accompanied by a sharp increase in weight. By 2 weeks there is great improvement in disposition and behavior. In some denuded areas, hairs appear shortly after the first injection; progressively hairs appear in other areas. The earlier hairs are lighter than normal while those emerging later are light at the tips and dark at the bases. Finally hairs appear which possess full pigmentation. Hairs attaining full length as early as 11 days after the initial injection are retained. By 4–6 weeks all animals appear normal.

Biopsies of skin show the epidermis of deficient animals to be noticeably thicker than that of controls. This thickening is primarily in terms of the stratum corneum although thickening in the stratum germinativum is also apparent. Mitotic figures in the basal layers are plentiful being slightly more numerous than in normal skin. The epidermis is moderately keratotic and contains abundant keratohyalin granules. The orifices of the pilosebaceous units are markedly dilated and are commonly plugged with keratinized debris. The sebaceous glands are for the most part normal although occasionally a gland appears disrupted. The hair follicles appear normal and often exhibit hairs in various stages of development. Also present are resting hairs the clubs of which are normal but frequently the shafts are broken below the surface of the skin.

Discussion. Incorporation of egg white in the diet of the hamster produces symptoms similar to those attributed to biotin deficiency in the mouse. In mice the rate and cycles of hair growth are unaffected by deficiency. The alopecia is the result of faulty hair retention which appears to be due to imperfect keratinization of the hair shaft adjacent to the club (Rauch[6]). The same is true of the hamster where hairs are observed to elongate at the normal rate but break off as full length is attained. Deficiency produces progressive achromotrichia in the hamster as well as in the mouse. Even during deficiency pigment is elaborated and incorporated into the growing hair. As the biotin level falls, however, so does the intensity of the pigment. In this way, the hair is progressively lighter from tip to base and from one hair generation to the next. The fact that this sequence is easily and quickly reversed upon administration of biotin is further indication that the process of pigment synthesis is particularly sensitive to biotin level.

Skin taken from deficient animals reveals changes resembling more those described by Montagna[7] for the mouse than those of the rat. In the hamster the skin is dry rather than covered with brownish incrustations as in the rat. There is only moderate keratosis in the hamster and the mouse as compared to the extensive hyperkeratosis developed in the rat. The sebaceous glands in the hamster seem to be less disturbed structurally than either in the mouse or rat, although the dryness of the skin is suggestive of impairment of sebaceous secretion.

The authors are indebted to Dr. Miriam Shaw, Mrs. Evelyn H. Russell and Mr. Morton Geller for able technical assistance. We also wish to thank Merck and Company, Inc. for the biotin and Lederle Laboratory Division, American Cyanamide Company for the sulfaguanidine used in this study.

This investigation was supported by a research grant, E-562, from the Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health, Public Health Service.

H. Rauch and W. B. Nutting

Zoology Department, University of Massachusetts, Amherst, Mass., July 14, 1958.

Zusammenfassung

Durch einen Eiweissgehalt von 40% in einer Diät wurde ein extremer Biotinmangel erzeugt. Folgende Symptome waren das Resultat: Wachstumshemmung, Hautentzündung (Dermatitis), Haarausfall und Verlust der Haarfarbe. Durch tägliche Dosen von 4 µg Biotin konnte dieser Zustand rasch gebessert werden.

[6] H. Rauch, Physiol. Zool. *25*, 145 (1952).

[7] W. Montagna, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *73*, 127 (1950).

Zur Frage der entzündungshemmenden Wirkung des Phenylbutazon bei hypothyreotischen Ratten

Am Formalin-Pfotenoedem normaler Ratten zeigt Phenylbutazon (Butazolidin Geigy) eine ausgeprägte anti-inflammatorische Wirkung (Domenjoz, Theobald, Wilhelmi, Wilhelmi *et al.*[1]). In der vorliegenden Arbeit berichten wir über den entzündungshemmenden Wirkungsgrad des Phenylbutazon an der Formalinarthritis hypothyreotischer Ratten.

Methodik. Den Versuchstieren verabreichten wir in 24stündigem Abstand 4-Methyl-2-Thiouracil (MTU) während einer Zeitspanne von 18 und 31 Tagen in einer Dosierung von 100 mg/kg/Tag per os (Emulsion mit Gummi arabicum). Der Entzündungsversuch (Methodik nach Domenjoz *et al.*[2]) erfolgte 24 Stunden nach der letzten MTU-Verabreichung. Phenylbutazon wurde in einer Dosierung von 200 mg/kg s. c. 30 min vor der subplantaren Injektion von 0,1 cm³ Formalin 3prozentig appliziert. Die Pfotenschwellung wurde 135 min nach Injektion des Phlogistikums gemessen.

Ergebnisse. Aus den Daten der Tabelle ist zu ersehen, dass Phenylbutazon 200 mg/kg s. c. an der normalen Ratte eine intensive Hemmung der Formalinentzündung

[1] R. Domenjoz, Arch. exp. Path. Pharmak. *225*, 14 (1955). – W. Theobald, Arch. int. Pharmacodyn. *103*, 17 (1955). – G. Wilhelmi, Medizinische 1591 (1952). – G. Wilhelmi und J. R. Currie, Schweiz. med. Wschr. *84*, 1315 (1954).

[2] R. Domenjoz, K. Mörsdorf, E. G. Stenger und W. Theobald, Arch. exp. Path. Pharmak. *230*, 325 (1957).

Tabelle. Antiphlogistische Wirkung von Phenylbutazon 200 mg/kg s.c. am Formalinpfotenoedem normaler und hypothyreotischer Ratten. *K* Kontrollen; *Ph* Phenylbutazon

Behandlung	Tierzahl *n*	Tiergewicht *g*	Schwellung in mm³ nach 135 min	$\varepsilon \pm$	Oedemhemmung in %	Sign. Diff. *D*
1. Normale Ratten						
K	33	145	214	11,4	—	—
Ph	20	147	85	15,8	60	6,7
2. 18 Tage 100 mg/kg/Tag p. o. MTU						
K	54	154	234	13,7	—	—
Ph	55	155	166	13,0	29	3,6
3. 31 Tage 100 mg/kg/Tag p. o. MTU						
K	57	150	189	13,7	—	—
Ph	60	164	138	13,1	27	2,7

von 60% bewirkt, während bei hypothyreotischen Ratten die Schwellung lediglich um 29 beziehungsweise 27% gehemmt wird. Hingegen wird durch die MTU-Vorbehandlung bei den jeweiligen Kontrollratten (234 beziehungsweise 189 mm³) keine nennenswerte Änderung der Schwellungsintensität gegenüber unbehandelten Tieren (214 mm³) ausgelöst.

Längerdauernde MTU-Behandlung der Ratten beeinflusst somit nicht die Fähigkeit des Pfotengewebes, auf eine Irritation im Sinne einer Entzündung zu reagieren. Ob die thyreostatische Wirkung des Phenylbutazon in Zusammenhang mit den beschriebenen Versuchsergebnissen steht, kann zur Zeit nicht beurteilt werden. Weitere Versuche sind zur Interpretation dieser Befunde erforderlich.

E. G. Stenger

Pharmakologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, 31. Juni 1958.

Summary

Following pretreatment of rats by 4-methyl-2-thiouracil the anti-inflammatory action of phenylbutazone on formalin edema is strongly diminuished.

PRO EXPERIMENTIS

Description of a Corona-Type Loudspeaker Used in Bioacoustic Research[1]

Rapid developments in jet-propulsion devices have focused interest in recent years on the problem of the effects of noise on man. It is now well established that intense acoustic noise can constitute a health hazard in several ways: (1) through causing ear damage; (2) through creating unsafe working conditions because of interference with speech communication, and (3) through causing general disabling effects not directly involved with hearing, such as excessive fatigue, extreme irritability, and loss of neuro-muscular coordination[2].

For several years we have used laboratory animals in studies of the harmful effects of intense noise on bodily functions other than hearing. These studies have shown that intense noise at low frequencies (140 decibels, 150-4800 cycles/s) does not seem to overtax the animal's adaptive defense mechanisms[3]. Some laboratory animals, however, can hear up to 40 kilocycles[4]. Presumably they also have maximal sensitivity at much higher frequencies than humans whose upper hearing limit is about 12–15 kilocycles. In view of this, it was felt necessary to extend our noise studies to much higher frequencies than were previously used.

Unfortunately, most of the available high frequency sound sources such as the Galton whistle or various air sirens can generate only one frequency at a time. In contrast, turbo-jet engines, besides producing low frequency sound, generate a wide-band high frequency spectrum. The present report deals with the design and construction of a high frequency sound source capable of producing intense noise over a wide-band frequency spectrum. The type of noise generator designed is basically a thermal sound source.

It has long been recognized that an electric arc discharge in air can serve as a thermal sound source. When such a discharge is interrupted or modulated at an audio rate, it is referred to as a 'singing arc'. Another type of electric discharge, the radio frequency corona, can also serve as a sound source when it is modulated. Due to its low efficiency, a speaker of this type was not considered practical for many years. However, by 1953 Siegfried Klein had developed a new corona type speaker which he called the 'Ionophone'[5]. In the Ionophone the sound is radiated directly from an audio modulated radio frequency corona at the apex of an air filled horn. Since there are no moving mechanical parts, only air molecules and ions, it was felt that the Ionophone might prove useful for biocacoustic studies of the effects of high intensity noise at higher frequencies than one can attain with conventional diaphragm type speakers.

[1] Authorized for publication as paper No. 2275 in the Journal Series of the Pennsylvania Experiment Station. This research was supported in part by the United States Air Force, under contract AF 33(616)-2505 monitored by Aero Medical Laboratory, Directorate of Research, Wright Air Development Center, Wright-Patterson Air Force Base, Ohio.

[2] H. Davis, Ann. Otology, Rhinology and Laryngology *58* [3], 732 (1949). – H. O. Parrack, *Noise-Causes, Effects, Measurement, Costs, Control.* Univ. of Mich. Press, Ann. Arbor, Mich. (1952) 45–53. – P. Bugard, Rapports du II[e] Congrès Technique Nationale de Sécurité et d'Hygiène du Travail, La Baule, Sept. 27–30, 1–14 (1953).

[3] A. Anthony and E. Ackerman, J. Acoust. Soc. Amer. *28* [2], 270–274 (1955). – A. Anthony and S. Babcock, Exper. *14* [3], 104 (1958).

[4] G. Pestalozza and H. Davis, Amer. J. Physiol. [3] *185*, 595-600 (1956).

[5] S. Klein, Acoustica *4*, 77 (1954).

Although commercial models were available, it was not known whether the Ionophone was purely a heat-maintained sound source or represented a speaker whose action depended on the direct acceleration of ions. Consequently, a low power 'Ionophone' model was constructed to determine some of the operational characteristics of corona speakers. This experimental model consisted of a Vycor glass speaker casing enclosing a platinum electrode tip and a self-excited radio frequency oscillator having a 60 watt output modulated by a 35 watt output audio amplifier. A block diagram of this system is shown in Figure 1 and some types of speakers which were designed and tested are shown in Figure 2. Later a high power 1·3 kilowatt model speaker was built for use in biological studies of intense high frequency sound effects on animals. The speaker design for this model is shown in Figure 3.

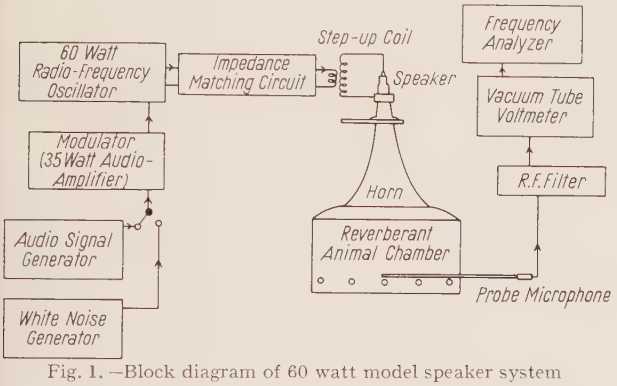


Fig. 1.—Block diagram of 60 watt model speaker system

A more extensive discussion of the detailed construction of various speaker models, analyses of noise fields and theoretical treatment of the underlying principle of operation of the corona loudspeaker is contained in a report by Fujio Oda[6].

Analyses of acoustic pressure levels were made for a modulating frequency range of 1-25 kilocycles with the 60 watt model and for the frequency range of 1–45 kilocycles with the 1·3 kilowatt model. These lie within the frequency range of hearing for the rat. The carrier frequencies used during sound pressure analyses were 1, 20

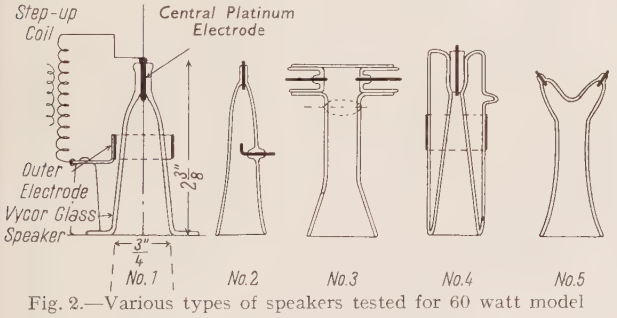


Fig. 2.—Various types of speakers tested for 60 watt model

and 100 megacylcles with the 60 watt model and at 16, and 28 megacycles using the 1·3 kilowatt model. In experiments made with both 60 watt and 1·3 kilowatt models, it was found that the efficiency of the speaker, in terms of acoustic pressure output, was independent of its carrier frequency. This result agrees with the interpretation that the corona acts as a thermal sound generator.

Additional tests were made to examine the effects on the sound pressure of cooling the corona with air and water. If sound generation from the corona is purely thermal in nature, lowering the corona temperature should increase its efficiency. This was experimentally verified when it was found that there was an increase of sound pressure following cooling of the corona by means of a water jacket surrounding the Vycor casing. Cooling was also supplemented with a continuous air stream around the platinum electrode tip.

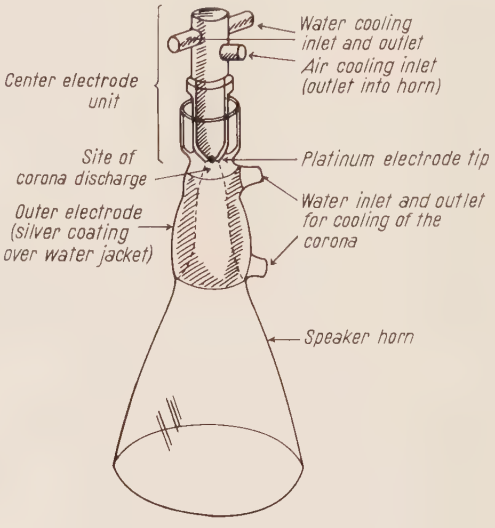

Water cooling inlet and outlet
Air cooling inlet (outlet into horn)
Center electrode unit
Site of corona discharge
Platinum electrode tip
Outer electrode (silver coating over water jacket)
Water inlet and outlet for cooling of the corona
Speaker horn

Fig. 3.—Design of 1·3 kilowatt model corona speaker

Frequency response curves showed that the efficiency begins to drop below 2·5 kilocycles and above 20 kilocycles. A representative acoustic response curve is shown in Figure 4 from which it can be seen that the maximum white noise pressure level is about 132 decibels (re 0·0002 dynes/cm²) using the 1·3 kilowatt model.

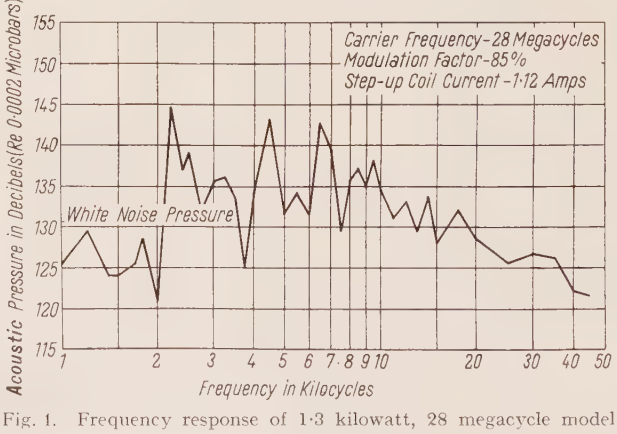


Fig. 4. Frequency response of 1·3 kilowatt, 28 megacycle model corona speaker

In summary, the above studies have resulted in the design and construction of a corona-type speaker system which is useful for bioacoustic studies of intense high frequency noise. The mechanism of sound generation by the corona speaker is thermal in nature. Sound is produced when the thermal energy of the modulated corona is converted into acoustic energy. Unlike the various air sirens employed by other workers, which permit the study of only one frequency at a time, the corona speaker system can produce intense noise levels which remain relatively flat over a wide frequency band.

Studies are now in progress to compare the relative tolerance of laboratory animals to intense noise at low

[6] F. Oda, *Corona Type Loudspeaker* (Masters Thesis, Pennsylvania State University, 1957).

and high frequencies[7]. It is hoped that such studies will yield valuable information regarding precautions necessary for insuring man's safety in the presence of excessive noise levels, as well as providing additional data on the mechanisms of adaptation of laboratory animals to non-lethal stimuli.

E. Ackerman, A. Anthony, and F. Oda

[7] A. Anthony and E. Ackerman, *Biological Effects of Noise in Vertebrate Animals* (Final Report, WADC TR 57-647, Wright Air Development Center, Dayton, Ohio 1957).

Biophysics Laboratories, Department of Physics and Department of Zoology and Entomology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, June 10, 1958.

Résumé

Un générateur thermo-ionique capable de produire des ondes acoustiques de haute intensité et de haute fréquence est décrit. Ce transformateur electro-acoustique est utile pour les études bio-acoustiques.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Unterliegt die Heimkehrgeschwindigkeit der Brieftauben hormonalen Einflüssen?

In memoriam Heinz Knieriem zu seinem 15. Todestage

Von Dida M. Clausen, G. Koller und H. Kuhnen*

Den Brieftaubenzüchtern, die ihre Tiere im Sommer an den Wettflügen der örtlichen Organisationen teilnehmen lassen, ist seit langem bekannt, dass die Heimkehrgeschwindigkeit ihrer Tauben unter anderem von der jeweiligen Situation des Fortpflanzungs- und Brutgeschäftes abhängig ist. Die Züchter sprechen hier von einer «Nestverfassung».

Wir übernehmen diesen Ausdruck, da im Mittelpunkt aller Verhaltungsweisen und physiologischen Erscheinungen, die zu dem Fortpflanzungs- und Brutgeschäft der Tauben in Beziehung stehen, immer das Nest steht. Die «Verlobung» eines Taubenpaares ist davon abhängig, dass der Täuber eine Nistmöglichkeit besitzt. Nach Heinroth[1] muss der Täuber «eine Wohnung mit in die Ehe einbringen». Der Verlobung folgt die Paarung und damit die Eheschliessung. Nur in künstlich herbeigeführten Zwangssituationen kann man erreichen, dass die Tiere den Paarungsakt vollziehen, ohne über einen Nistplatz zu verfügen (Heinroth[1], Clausen und Kuhnen[2]).

Gesteuert werden diese Verhaltensweisen weitgehend durch Hormone. Ausgelöst von den Gonadenhormonen – die ihrerseits nach der Stimulierung der Gonaden durch das gonadotrope Hormon der Hypophyse ausgeschüttet werden – erfolgt die Paarung, Nestbau und Zu-Neste-Treiben und schliesslich die Eiablage. Mit der Eiablage beginnt die Produktion von gonadotropem Hormon in der Hypophyse abzuklingen. Dafür wird jetzt Prolaktin ausgeschüttet, das die Bildung der Brutflecke und die Kropfmilchproduktion anregt (Riddle, Bates und Dykshorn[3]). Das Prolaktin veranlasst jedoch nicht nur die Kropfmilchsekretion, sondern bewirkt gleichzeitig die Rückbildung der Gonaden (Bates, Riddle und Lahr[4]). Die Kropfmilchbildung beginnt 9 Tage nach der Eiablage und erreicht mit dem Schlüpfen der Jungen ihren Höhepunkt. 2–3 Tage später klingt sie wieder ab, um nach 6–8 Tagen zu erlöschen. Jetzt beginnt erneut die Produktion von gonadotropem Hormon. 10–15 Tage nach dem Schlüpfen der Jungen kommt es zu einer erneuten Paarungsbereitschaft. 16–22 Tage nach dem Schlüpfen der Jungen sitzt das Alttaubenpaar auf einem neuen Gelege. Die Jungen des ersten Geleges werden jedoch zu dieser Zeit noch von den Alten versorgt. Es werden «Schachtelbruten» grossgezogen (Heinroth[1]).

Da angepaarte Alttauben nicht nur zum Heimatort, sondern auch zu ihrem Partner und zum Nest, das heisst zu ihren Eiern oder ihren Jungen zurückfliegen, ist es durchaus denkbar, dass die Nestverfassung einen Einfluss auf die Heimkehrgeschwindigkeit ausüben kann.

Die Heimkehrleistung der Brieftauben beruht unseres Erachtens also auf zwei genetisch fixierten Anlagen: 1. dem Trieb, nach Hause zu fliegen und 2. der Fähigkeit zur Fernorientierung.

Die Frage der Orientierung, die von Kramer[5] und Matthews[6] untersucht wurde, wurde in unseren Beobachtungen nicht berührt. Das Orientierungsvermögen der Tauben wurde als gegebene Tatsache hingenommen.

Was die bis zu 1000 km vom Heimatort entfernt aufgelassenen Brieftauben veranlasst zurückzufliegen, kann mit dem Begriff «Standorttreue» bezeichnet werden. Ein Zugtrieb oder Relikte eines solchen dürften als Auslöser ausscheiden. Die Vorfahren unserer Brieftauben, die Felsentauben (*Columba livia*), sind keine Zugvögel.

Was aber sind die Ursachen dieser grossen Standorttreue? Kann sie durch Umweltbedingungen, wie der Besitz eines Revieres, Futterangebot, Pflege und Bindung an den Menschen oder durch physiologische Vorgänge, wie hormonale Einflüsse, gesteigert oder abgeschwächt werden? Die vorliegende Arbeit soll eine Voruntersuchung zur Klärung dieser Frage darstellen.

Nach den oben geschilderten hormonalen Vorgängen während des Brutgeschäftes teilen wir die Nestverfassung in folgende Phasen ein:

a) Das Zu-Neste-Treiben. Einfluss der Sexualhormone.

b) Brüten auf 1–9 Tage alten Eiern, *ohne* Kropfmilchbildung. Abklingende Wirkung der Sexualhormone, Beginn der Prolaktinwirkung.

c) Brüten auf 10–17 Tage alten Eiern, *mit* Kropfmilchsekretion, Prolaktinwirkung.

d) Hudern der 1–7 Tage alten Jungen, Kropfmilchfütterung, Prolaktinwirkung.

e) Hudern der über 7 Tage alten Jungen, Körnerfütterung, abklingende Prolaktinwirkung und beginnende Wirkung der Sexualhormone.

f) Versorgung der über 10 Tage alten Jungen und erneutes Zu-Neste-Treiben, hormonaler Zustand wie unter a).

g) Versorgung der über 15 Tage alten Jungen und Bebrüten eines neuen Geleges, hormonaler Zustand wie unter b).

* Aus dem Zoologischen Institut der Universität des Saarlandes, Direktor Prof. Dr. G. Koller, Saarbrücken.

[1] O. Heinroth und K. Heinroth, Z. Tierpsychol. *6*, 153 (1948).

[2] D.-M. Clausen und H. Kuhnen, Ann. Univ. Saraviensis, Scientia *7*, 39 (1958).

[3] O. Riddle, R. W. Bates, und S. W. Dykshorn, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *29*, 1211 (1932); Amer. J. Physiol. *105*, 191 (1933).

[4] R. W. Bates, O. Riddle, und E. L. Lahr, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *31*, 1233 (1934).

[5] G. Kramer, Orn. Ber. *4*, 227 (1948).

[6] G. V. T. Matthews, J. exp. Biol. *28*, 508 (1951).

Ist ein Taubenpaar einmal im Zustand c) angelangt, so vollzieht sich das weitere Brutgeschäft in einem Zyklus, in dem die Zustände c–g immer wieder aufeinander folgen (Abb. 1).

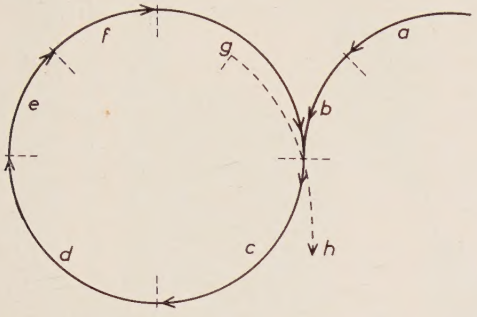


Abb. 1. Brutzyklus eines Taubenpaares. Ist nach der Anpaarung im Frühjahr das Stadium *c* erreicht, so vollzieht sich das weitere Brutgeschäft im Sinne des Kreises *c–g*.

Als messbare Grösse für den Einfluss der Hormone bzw. der Phasen der Nestverfassung auf die Standorttreue diente uns die Heimkehrgeschwindigkeit unserer Tauben. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die absolute Fluggeschwindigkeit, selbst bei gleichen Entfernungen, starken Schwankungen unterliegen kann, da sie weitgehend von Wind und Wetter abhängt. Sie kann nach eigenen Beobachtungen zwischen 45 und 105 km/h betragen. Jedoch sind bei allen «Wettflügen» die relativen Unterschiede der Geschwindigkeiten einer Taube gegenüber der Durchschnittsgeschwindigkeit aller anderen Tauben stets die gleichen.

Die Beobachtungen wurden an unserem seit 4 Jahren gehaltenen Brieftaubenstamm gemacht (Clausen und Kuhnen[2]). Die Tiere nahmen an den vom Kreisverband Saarbrücken der Vereinigung deutscher Reisetaubenliebhaber e. V. veranstalteten Wettflügen teil. In den Jahren 1955 und 1956 lagen die Auflassorte in W–SW-Richtung. Die Tauben wurden in Chaumont 200 km, Beaune 300 km, Nevers 380 km, Montluçon 480 km und Limoges 580 km gestartet. 1957 flogen die Tauben von Auflassorten in SO-Richtung: Bruchsal 120 km, Ludwigsburg 170 km, Aalen (Württ.) 230 km, Ingolstadt 330 km, Plattling 440 km und Passau 490 km.

Die Beteiligung an den Wettflügen bietet uns ausser billiger und bequemer Beförderung der Tauben 2 Vorteile:

1. Die Ankunftszeiten der heimkehrenden Tauben werden mit präzisen Konstatieruhren registriert. Die Tauben, die unter den ersten 25% aller gestarteten Tiere ihre Heimatschläge erreichen, werden in Listen mit genauer Angabe der Ankunftszeiten und der Fluggeschwindigkeiten erfasst (siehe Knieriem[7]).

2. Wir können die Heimkehrgeschwindigkeit unserer eigenen Tauben mit einer grossen Zahl fremder Tiere vergleichen, nehmen doch an jedem Wettflug 1000–4000 Tauben teil.

Vergleicht man die Zahl der eigenen Tiere, die unter den ersten 25% aller gestarteten Tiere heimkehren, so hat man ein gutes Mass für ihre relative Heimkehrgeschwindigkeit gegenüber einer genügend grossen Zahl fremder Tiere. Eine statistische Sicherung der eigenen Beobachtungen lässt sich nur aus dem Vergleich mit solch grossen Zahlen belegen. Einzelbeobachtungen könnten hier leicht ein falsches Bild ergeben.

Die von uns zur Beobachtung verwendeten Tiere waren 1–2 Jahre alt und in der Reisezeit stets angepaart. Die Tauben waren bereits als Jungtiere auf Entfernungen bis 200 km trainiert, jedoch wurden die Heimkehrergebnisse der noch nicht geschlechtsreifen Jungtiere nicht berücksichtigt. Jungtiere fliegen nach Matthews[6] nur «for home and food» zum Heimatschlag zurück.

Um vergleichbare Messwerte der Geschwindigkeit zu erhalten, muss für alle beteiligten Tauben prinzipiell die Möglichkeit bestehen, die gleiche Heimkehrgeschwindigkeit zu entwickeln. Dies ist bei Brieftauben für mindestens 80% aller an den Wettflügen teilnehmenden Tiere gegeben, da die Mehrzahl der Züchter sorgfältig darauf achtet, nur Tauben in bestem Gesundheitszustand an den Wettbewerben teilnehmen zu lassen (Knieriem[7]).

Als Kriterium für den Gesundheitszustand diente uns neben allgemeinen Beobachtungen (zum Beispiel frisches, munteres Benehmen) hauptsächlich die Gewichtskonstanz der Tiere. Die Tauben wurden das ganze Jahr hindurch einmal pro Woche gewogen. In der Reisezeit wurde das Gewicht vor und nach den Flügen kontrolliert. Tiere mit Untergewicht wurden nicht zu den Beobachtungen herangezogen.

Es wurden innerhalb von drei Jahren die Heimkehrleistungen von 136 Tauben beobachtet, und zwar von 81 ♂ und 55 ♀. Von diesen Tieren kehrten 44 unter den ersten 25% aller zum Wettflug gestarteten Tauben zurück (= 32%). Die geflogenen Entfernungen betrugen 120–580 km. Abbildung 3a gibt eine Übersicht über die Schwankungen der Heimkehrgeschwindigkeit in Abhängigkeit von den oben beschriebenen Phasen der Nestverfassung.

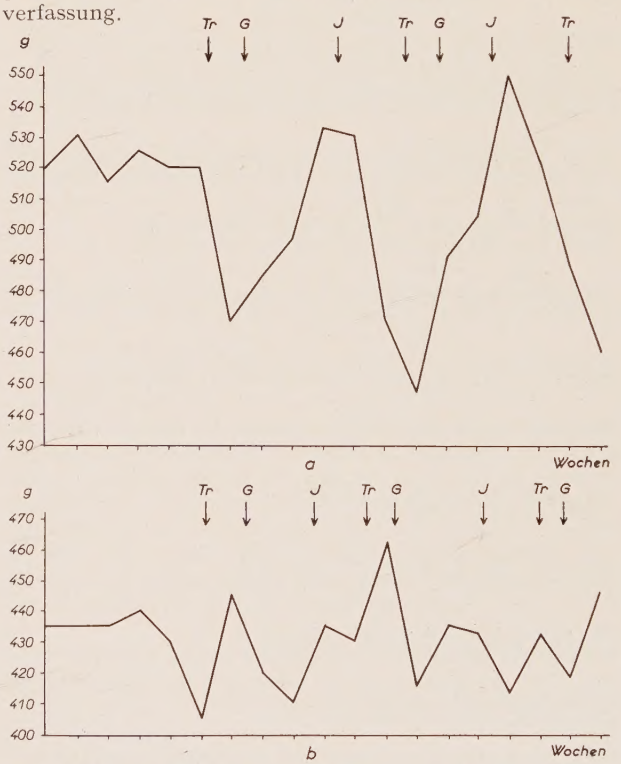


Abb. 2. Wöchentliche Gewichtsschwankungen der Tauben in g, von *a*) einem ♂ und *b*) einem ♀, während des Brutgeschäftes.
Tr = Zu-Neste-Treiben, *G* = Gelege, *J* = Junge

Desgleichen schieden Tauben, die nach unseren oben angegebenen Phasen der Nestverfassung beim Zu-Neste-Treiben waren, für unsere Versuche aus. Bei Täubinnen verbietet sich dies, da es während des Transportes oder gar am Flugtage zur Eiablage kommen könnte. Täuber jedoch nehmen während des Zu-Neste-Treibens meist nur die nötigste Futtermenge auf und sind zum anderen durch das ständige Herumlaufen gegenüber anderen Tauben in einer körperlich schlechteren Verfassung (Abb. 2). Aus-

[7] H. Knieriem, Z. Tierpsychol. *5*, 131 (1943).

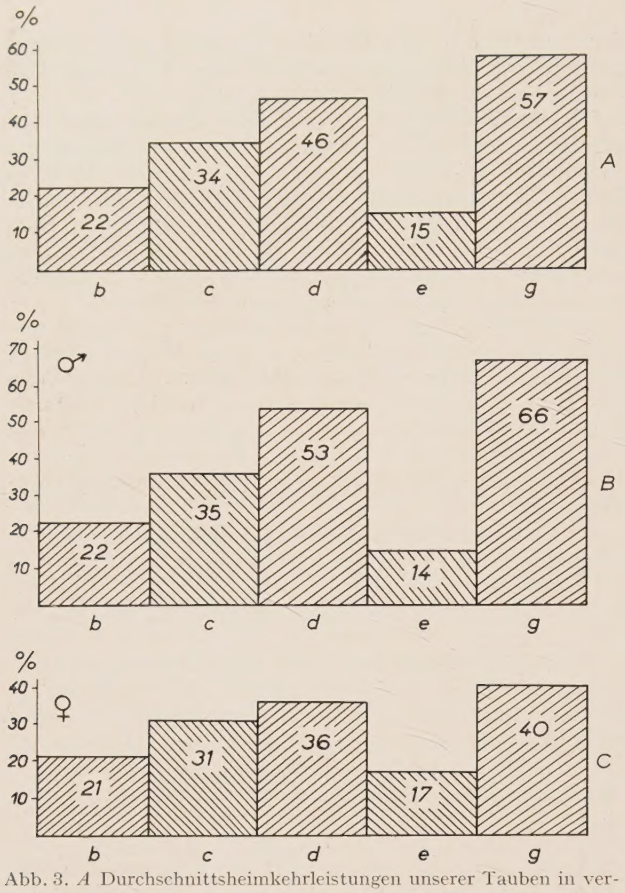


Abb. 3. *A* Durchschnittsheimkehrleistungen unserer Tauben in verschiedenen Nestverfassungen. – *B* Heimkehrleistung der ♂ bei verschiedenen Phasen der Nestverfassungen. – *C* Heimkehrleistung der ♀ bei verschiedenen Phasen der Nestverfassungen: *b* = 1–9 Tage Eier, *c* = 10–17 Tage Eier, *d* = 1–7 Tage Junge, *e* = 8–15 Tage Junge, *g* = über 15 Tage Junge und neues Gelege.
Die Prozentzahlen geben den Prozentsatz der eigenen Tauben an, die in der jeweiligen Nestverfassung unter den ersten 25% aller gestarteten Tauben heimkehrten.

serdem ist aus zahlreichen Einzelerfahrungen vielen Züchtern und uns aus schlechten Heimkehrleistungen bekannt, dass Täuber im Stadium des Zu-Neste-Treibens oft sehr hohe Geschwindigkeiten fliegen. Nicht immer können sie diese grosse Anstrengung durchhalten, sie geben vorzeitig ermattet auf oder fliegen blind über das Ziel hinaus. In beiden Fällen ist entweder ein Verlust der Taube oder eine sehr verspätete Heimkehr die Folge. Die Fluggeschwindigkeit ist nicht mehr exakt messbar. Deshalb schied diese Phase der Nestverfassung für unsere Beobachtungen vorläufig aus.

Auch der Mauserzustand der Tiere muss beachtet werden. Die Tauben mausern den Sommer über die 10 Schwungfedern erster Ordnung (Hand- und Fingerschwingen). Tiere, bei denen eine nachwachsende Schwinge nicht mindestens 2 cm abgespult ist, müssen zu Hause behalten werden. Es besteht sonst die Gefahr, dass bei grösseren Anstrengungen die heranwachsende Feder verkrüppelt. Auch Tiere, bei denen infolge der Mauser eine der Fingerschwingen (1., 2., 3. und 4. Schwungfeder) nicht voll ausgebildet ist, sind für unsere Beobachtungen nicht zu verwenden. Da diese Schwungfedern beim Fliegen den Vortrieb leisten, sind Tiere, die nicht über voll ausgewachsene Fingerschwingen verfügen, von vornherein flugtechnisch im Nachteil.

Das Diagramm veranschaulicht, dass die Verfassungen b) und g), denen ein physiologisch gleicher Zustand, nämlich eine abklingende Wirkung der Sexualhormone und eine beginnende Prolaktinwirkung, zugrunde liegt, verschiedene Ergebnisse zeigen. Die bessere Heimkehrleistung in Verfassung g) ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass neben dem bebrüteten Gelege noch halberwachsene Jungtiere zu betreuen sind. Es scheint hier ein Zusammenwirken physiologischer und psychologischer Faktoren vorzuliegen.

In der Verfassung d) (1–7 Tage alte Junge), in der die Tiere nur der Prolaktinwirkung unterliegen, ist die Heimkehrgeschwindigkeit ebenfalls deutlich gesteigert.

Das schlechteste Heimkehrergebnis zeigen Tiere mit 8–14 Tage alten Jungen (Phase e). Die Sorge um die Brut hat in diesem Stadium schon nachgelassen und die beginnende Testosteron- bzw. Follikelhormonwirkung bringt die Tiere in eine ähnliche Verfassung, wie sie beim Zu-Neste-Treiben beschrieben wurde.

Betrachtet man die Heimkehrergebnisse von ♂ und ♀ getrennt, so ergibt sich bei beiden Geschlechtern etwa das gleiche Bild (Abb. 3 *B* und *C*). Die Diagramme 3*A* und 3*B* zeigen, dass dieses Verhalten nur quantitativ voneinander abweicht. ♀ sind nicht so starken Schwankungen unterworfen wie ♂. Daher erreichen die Leistungen der ♀ nicht die Spitzenwerte der ♂, sind aber gleichmässiger.

Es lässt sich also eine stetige Steigerung der Heimkehrgeschwindigkeit von Nestverfassung b) bis d), ein Absinken bei e) und ein Maximum bei g) feststellen.

Die Heimkehrgeschwindigkeit steigert sich in dem Masse, wie die Wirkung der Sexualhormone ab- und die Prolaktinwirkung zunimmt. Die erhebliche Leistungssteigerung in Verfassung g) (grosse Junge und frisches Gelege) dürfte, wie schon angeführt, zum Teil durch einen psychogenen Faktor hervorgerufen werden. Der Reiz, den die noch versorgungsbedürftigen Jungtiere ausüben, spielt sicher eine nicht geringe Rolle, wissen wir doch, dass Tauben durch visuelle Faktoren leicht zu beeinflussen sind. Wie wir des öfteren beobachten konnten, ändert zum Beispiel ein Paar, das im Stadium des Zu-Neste-Treibens ist, sein Verhalten, wenn man ihm ein Ei in sein Nest legt. Der Täuber hört auf, die Täubin zu «treiben», und beide Partner bewachen von diesem Augenblick an Ei und Nest.

Die Variation der Heimkehrgeschwindigkeit ist also unter den von uns geschilderten Bedingungen von zwei Faktoren abhängig: Einmal von einer hormonalen Beeinflussung und zum anderen von einem psychogenen Faktor. Nach unseren Ergebnissen scheint der Einfluss des Prolaktins eine wesentliche Rolle zu spielen. Die Alleinwirkung der Sexualhormone konnte bisher noch nicht eingehend untersucht werden.

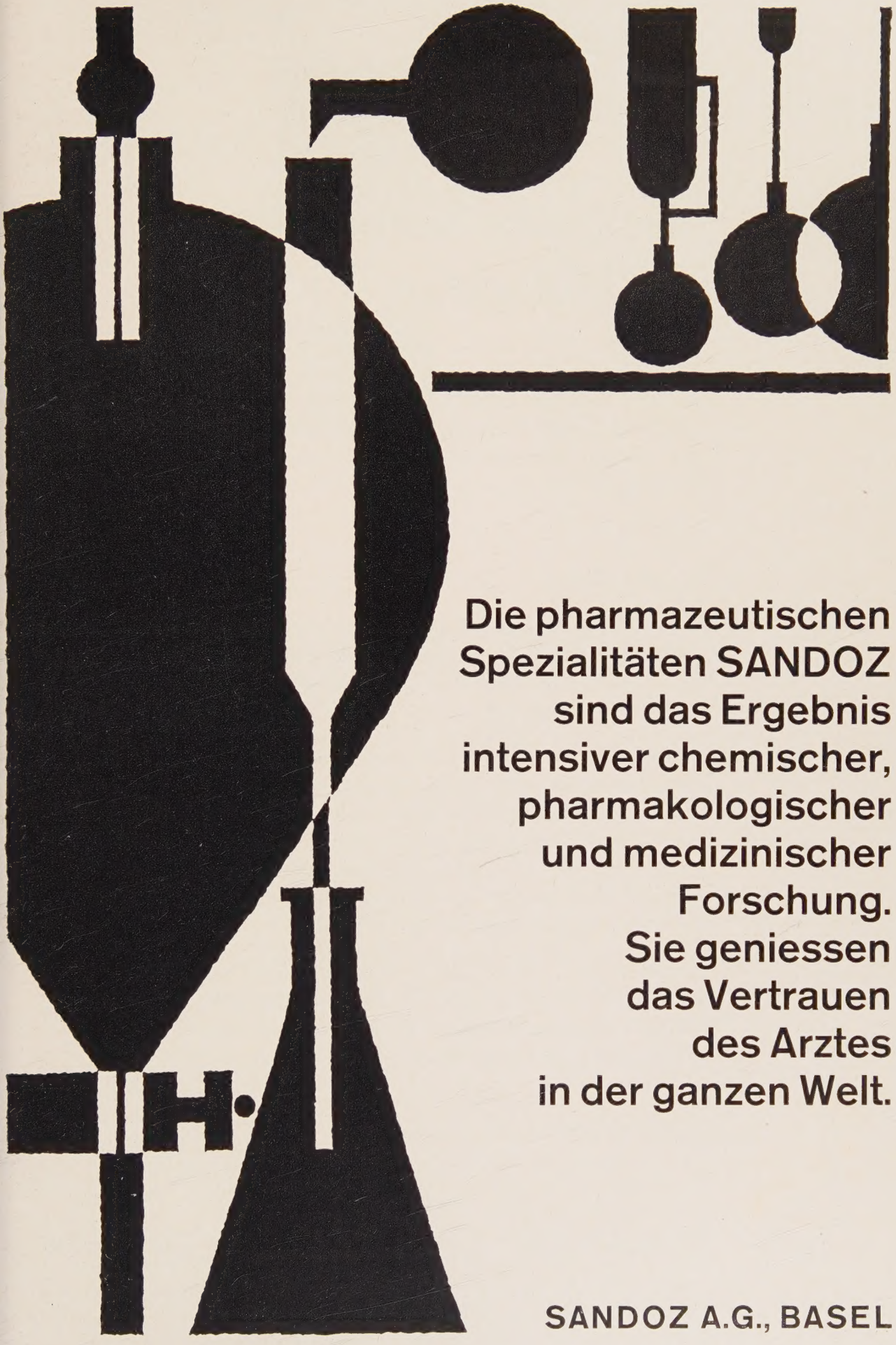
Zum Abschluss sei betont, dass Tauben verschiedener Zuchtstämme in ihrem Hormonhaushalt Schwankungen unterliegen (Bates, Riddle und Lahr[4]). Dies erklärt, warum die Brieftaubenzüchter bis heute noch nicht zu einer einheitlichen Auffassung über die günstigste Phase der Nestverfassung zur Erzielung einer optimalen Heimkehrgeschwindigkeit gelangt sind. In gut durchgezüchteten Stämmen treten individuelle Unterschiede im Hormonhaushalt nur in geringem Masse auf.

Durch weitere Versuche (Kastration, Hormonzufuhr usw.) sollen die in dieser Arbeit angeschnittenen Fragen weiter geklärt werden.

Summary

The relation between the 'homecoming-speed' of carrier-pigeons and the influence of sexhormones and prolaktin is reported.

It is further examined whether the influence of prolaktin (breeding on 10–15 days old eggs) or psychological factors (feeding of young individuals of more than 15 days) are the factors, accelerating the 'homecoming-speed'. Best results are obtained by combining breeding 1–6 days old eggs and feeding young pigeons of 2–3 weeks.



Die pharmazeutischen
Spezialitäten SANDOZ
sind das Ergebnis
intensiver chemischer,
pharmakologischer
und medizinischer
Forschung.
Sie geniessen
das Vertrauen
des Arztes
in der ganzen Welt.

SANDOZ A.G., BASEL

Wilfred A. Sexton

Chemische Konstitution und biologische Wirkung

Nach der englischen Ausgabe von „Chemical Constitution and Biological Activity" ins Deutsche übertragen von *Friedrich Hölscher* und *Georg Hübscher*. 1958. XI, 439 Seiten mit 12 Abbildungen und 53 Tabellen. Ganzleinen DM 29.60.

Aus dem Geleitwort

Die Beziehung, die zwischen der chemischen Konstitution einer Substanz und ihrer Wirkung auf die lebende Zelle besteht, hat seit Generationen wie ein Magnet das Interesse der Chemiker und Biologen angezogen und ihre Tatkraft beansprucht.

Der Chemiker oder Biologe, der einen Einblick in dieses Gebiet erlangen möchte, steht angesichts der umfangreichen und ständig zunehmenden Literatur, die über viele wissenschaftliche Zeitschriften und zusammenfassende Darstellungen verstreut ist, vor einer schwierigen Aufgabe. Aus diesem Grund scheint eine Monographie, in der das gesamte vorliegende Material kritisch gesichtet und in einem Band dargestellt ist, höchst wünschenswert; sie füllt zweifellos eine Lücke in der Literatur.

Ich möchte daher die vorliegende Monographie Studenten, Wissenschaftlern und all denen warm empfehlen, die den gegenwärtigen Stand unseres Wissens über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung kennenlernen möchten.

A.R. Todd

Prospekt mit Inhaltsangabe vorhanden.

Verlag Chemie · GmbH. · Weinheim / Bergstrasse